

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Ana Carolina Ferreira Piazzzi

CONSTRUÇÃO DE MODELOS MATEMÁTICOS PARA PROCESSOS
FERMENTATIVOS –
AVALIAÇÃO DE EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

Santa Maria, RS

2019

Ana Carolina Ferreira Piazzì

**CONSTRUÇÃO DE MODELOS MATEMÁTICOS PARA PROCESSOS
FERMENTATIVOS –
AVALIAÇÃO DE EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) para obtenção do grau de **Mestre em Engenharia Química**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Nina Paula Gonçalves Salau
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Raquel Cristine Kuhn

Santa Maria, RS
2019

Piazzzi, Ana Carolina Ferreira
CONSTRUÇÃO DE MODELOS MATEMÁTICOS PARA PROCESSOS
FERMENTATIVOS - AVALIAÇÃO DE EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE
CULTIVO / Ana Carolina Ferreira Piazzzi.- 2019.
143 p.; 30 cm

Orientadora: Nina Paula Gonçalves Salau
Coorientadora: Raquel Cristine Kuhn
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química, RS, 2019

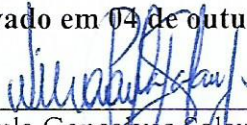
1. Modelagem e Simulação 2. Bioprocessos 3. Condições
de Cultivo 4. Microrganismos 5. Estimação de Parâmetros
I. Salau, Nina Paula Gonçalves II. Kuhn, Raquel Cristine
III. Título.

Ana Carolina Ferreira Piazzi


**CONSTRUÇÃO DE MODELOS MATEMÁTICOS PARA PROCESSOS
FERMENTATIVOS –
AVALIAÇÃO DE EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO**

Dissertação apresentada ao
Curso de Mestrado do Programa
de Pós-Graduação em
Engenharia Química da
Universidade Federal de Santa
Maria (UFSM, RS) para
obtenção do grau de **Mestre em
Engenharia Química.**

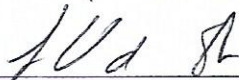
Aprovado em 04 de outubro de 2019:




Nina Paula Gonçalves Salau, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)



Raquel Cristine Kuhn, Dra. (UFSM)
(Coorientadora)



Lucielen Oliveira dos Santos, Dra. (FURG)



Christian Luiz da Silveira, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2019

*Dedico este trabalho à pessoa que mais
acreditou em mim e em meus sonhos,
minha querida Vó Elza.*

Agradecimentos

Enfim chegou o grande dia. O dia de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram e tornaram possível que eu chegasse até aqui. Dia de agradecer aqueles que mesmo de longe souberam ser colo quando a jornada foi árdua, que escutaram por telefone os choros, as risadas, os desabafos, os dramas... e que, souberam acalantar um coração às vezes triste, com palavras de afeto: então meu muito obrigada mãe, pai e irmão, vocês foram e são essenciais na minha jornada!!!

Dia de agradecer aquela que foi de suma importância nessa etapa da minha vida: aquela que ensinou, orientou, apoiou, aconselhou, corrigiu, conversou, orientou, ensinou, ensinou, ensinou e nunca cansa de ensinar: a melhor orientadora que a vida me proporcionou: a professora Nina. Nada disso seria possível sem você chefe! Quem dera que todos tivessem a sorte de ter uma orientadora que ama e sabe o que faz, que tem prazer em ensinar, que acredita nos alunos e que desperta neles a vontade de ser cada vez melhor. Muito obrigada chefe!!! Agradeço também a minha coorientadora Raquel, por todo apoio ao longo do trabalho.

Dia de agradecer aqueles que se tornaram uma segunda família para mim aqui em Santa Maria: aos meus primos, que acompanharam de perto e foram presentes em cada momento dessa caminhada. Dia de agradecer aos amigos que se tornaram família e que fizeram de Santa Maria um lar para mim. Então muito obrigada aquela amiga/irmã, Mayara, que esteve presente em todos os momentos, seja nos dias de luta no laboratório, seja nas risadas, nos choros, na vida fitness, no desespero, nos dramas e, acima de tudo por todo apoio e por estar sempre pronta para aconselhar e puxar a orelha. A melhor companheira de estudos: Jandira, obrigada por sempre acreditar em mim e me apoiar. Ao menino gênio, Jean, por toda paciência em tirar as dúvidas sobre programação, pelos mates, cafés e risadas sem fim, e por sempre estar disposto a ajudar com todos os problemas. Obrigada aos colegas do LEPAC: Paola, Pedro, Mikael e Leoni pela companhia e conversas diárias. Sem vocês nada disso seria possível também, sou eternamente grata pela amizade de vocês!!!

Agradeço também ao meu querido colega, Alisson, por toda paciência em me ensinar a respeito de carotenoides, por todas as conversas no laboratório e por ter transformado o trabalho em diversão. Muito obrigada querido.

À CAPES, pela bolsa de estudos. À UFSM, pela oportunidade de realização do mestrado. E por fim, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

A todos o meu mais sincero: Muito obrigada!!!

*"Nunca permita que a imaginação
limitada dos outros, limite você" - Mae
Jemison*

RESUMO

CONSTRUÇÃO DE MODELOS MATEMÁTICOS PARA PROCESSOS FERMENTATIVOS – AVALIAÇÃO DE EFEITOS DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO

AUTORA: Ana Carolina Ferreira Piazzì
ORIENTADORA: Nina Paula Gonçalves Salau
COORIENTADORA: Raquel Cristine Kuhn

A modelagem matemática de processos fermentativos apresenta-se como uma ferramenta de melhoria e auxílio no entendimento de tais processos, tendo por objetivo fundamental a predição da dinâmica do processo. Além disso, os modelos permitem organizar as informações a respeito do processo em conjunto e de forma coerente. Entretanto, há uma escassez de modelos específicos para descrever e prever fermentações mediante as diversas modificações realizadas para melhorar a performance do processo. No presente trabalho, a modelagem e a simulação de 4 estudos de caso (sendo 3 de trabalhos anteriores) foram desenvolvidas e analisadas para prever o crescimento de microrganismos quando as condições de cultivo influenciaram parte do processo. Para isso, avaliou-se a influência da aplicação de campo magnético e iluminância no crescimento da microalga *Spirulina* sp., para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* avaliou-se a influência da aplicação de campo magnético, agitação e aeração em seu crescimento, consumo de substrato e obtenção de glutatona e, para a levedura *Phaffia rhodozyma* cultivada sem influência de fatores externos, avaliou-se seu crescimento, consumo de substrato e obtenção de carotenoides. A estimação dos parâmetros das equações dos modelos foi realizada por meio de combinação híbrida de otimização por enxame de partículas e algoritmo de mínimos quadrados não-lineares. Foram utilizados dados experimentais para validar os modelos e demonstrar sua precisão e confiabilidade. Os resultados demonstraram que os modelos propostos apresentam maior poder de predição para os processos estudados, quando comparados com aqueles encontrados na literatura. O modelo para crescimento da *Spirulina* sp. que leva em consideração a influência de campo magnético e iluminância apresentou um maior poder de predição quando comparado ao modelo de Verhulst, apresentando os melhores ajustes para a curva de crescimento desse microrganismo. O uso de redes neurais artificiais para a predição de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* mediante aplicação de campo magnético, agitação e aeração, apresentou uma elevada capacidade para a predição dos dados experimentais, sendo capaz de avaliar a influência dessas variáveis no processo como um todo. O modelo proposto para avaliar a interação entre o microrganismo e o substrato mostrou-se mais eficaz para prever e descrever o consumo de substrato para fermentações submersas, quando comparado à equação de Pirt, demonstrando que a interação microrganismo/substrato necessita de investigação. O crescimento da levedura *Phaffia rhodozyma*, assim como o consumo de substrato, foram melhores descritos e preditos por meio da equação de Contois e do modelo proposto para o consumo de substrato, respectivamente. Modelos para obtenção de bioprodutos, como os carotenoides produzidos pela *Phaffia rhodozyma* necessitam de estudos mais aprofundados para melhorar a sua capacidade de predição. Além disso, demonstraram que o desenvolvimento de modelos que considerem os efeitos das condições de cultivo torna-se extremamente importante para descrever com maior fidelidade os processos reais.

Palavras-Chave: Modelagem. Microalga. Levedura. Carotenoides. Condições de Cultivo. Estimação de Parâmetros.

ABSTRACT

CONSTRUCTION OF MATHEMATICAL MODELS FOR FERMENTATIVE PROCESSES - EVALUATION OF CULTURE CONDITIONS EFFECTS

AUTHOR: Ana Carolina Ferreira Piazzzi

ADVISOR: Nina Paula Gonçalves Salau

COADVISOR: Raquel Cristine Kuhn

The mathematical modeling of fermentative processes is presented as a tool for improving and understanding of such processes, which has the main objective to predict the dynamics of the process. Besides, the models allow organizing the information about the process in a simultaneously and organized way. However, there is a lack of specific models to describe and predict fermentations through the various modifications made to enhance the process performance. In the present work, the modeling and simulation of 4 case studies (3 of them from previous works) were developed and analyzed to predict the growth of microorganisms when culture conditions influence part of the process. For this purpose, the influence of the application of the magnetic field and the illuminance on the growth of the microalgae *Spirulina* sp. was evaluated. For the *Saccharomyces cerevisiae* yeast, the influence of the application of magnetic field, agitation and aeration on its growth, substrate consumption and, glutathione yields were evaluated and, for yeast *Phaffia rhodozyma* cultivated without the influence from external factors, its growth, substrate consumption, and carotenoid yield was evaluated. The estimation of the parameters of the model equations was performed by a hybrid combination of the optimization particle swarm and the nonlinear least-squares algorithm. Experimental data were used to validate the models and demonstrate their accuracy and reliability. The growth model of *Spirulina* sp., which takes into account the influence of the magnetic field and illuminance, presented a higher predictive power when compared to the Verhulst model, presenting the best fit for the growth curve of this microorganism. The use of artificial neural networks to predict *Saccharomyces cerevisiae* growth by application of the magnetic field, the agitation and the aeration showed a high capacity of predicting the experimental data, being able to entirely evaluate the influence of these variables in the process. The proposed model to evaluate the interaction between the microorganism and the substrate proved to be effective to predict and describe the substrate consumption for submerged fermentation, when compared to the Pirt equation, demonstrating that the microorganism/substrate interaction needs investigation. *Phaffia rhodozyma* yeast growth as well as substrate consumption were better described and predicted using the Contois equation and the proposed model for substrate consumption, respectively. Models for bioproducts such as carotenoids produced by *Phaffia rhodozyma* need further study to improve their predictive capacity. Further, the results also demonstrated that the development of models that consider the effects of culture conditions is of utmost importance to describe more accurately the real processes.

Keywords: Modeling. Microalgae. Yeast. Carotenoids. Culture Conditions. Parameter Estimation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos e seus produtos oriundos de processos fermentativos.	25
Tabela 2 - Parâmetros cinéticos obtidos experimentalmente para o cultivo da <i>Spirulina</i> sp..	60
Tabela 3 - Equações matemáticas propostas para serem utilizadas no modelo projetado para prever o crescimento de microalgas com aplicação de <i>CM</i> e <i>I</i>	61
Tabela 4 - Equações matemáticas propostas para serem utilizadas no modelo projetado para prever a inibição pelo <i>CM</i> no crescimento de microalgas.	62
Tabela 5 - Configurações da estrutura utilizadas para a ANN.....	64
Tabela 6 - Parâmetros cinéticos para a <i>S. cerevisiae</i>	67
Tabela 7 - Modelos matemáticos para prever o consumo de substratos e o crescimento do microrganismo.	72
Tabela 8 - Composição do meio de cultura <i>YM</i>	73
Tabela 9 - Preparação das diluições da solução padrão de glicose 1,0 g L ⁻¹	74
Tabela 10 - Modelos matemáticos para o crescimento da levedura <i>P. rhodozyma</i>	77
Tabela 11 - Parâmetros cinéticos experimentais.....	78
Tabela 12 - Modelos matemáticos para a obtenção de carotenoides totais obtidos a partir da fermentação da levedura <i>P. rhodozyma</i>	78
Tabela 13 - Parâmetros estimados para cada modelo proposto.	82
Tabela 14 - Avaliação estatística das equações propostas no modelo projetado para prever o crescimento da microalga com iluminância e aplicação de <i>CM</i>	83
Tabela 15 - Avaliação estatística dos melhores modelos propostos em comparação com o modelo de Verhulst para prever o crescimento de microalgas quando há influência da iluminância e aplicação de <i>CM</i>	84
Tabela 16 - Parâmetros estimados para avaliar o efeito da <i>I</i> e do <i>CM</i>	87
Tabela 17 - Avaliação estatística para as equações que predizem o crescimento de microalgas com inibição por <i>CM</i>	88
Tabela 18 - Avaliação estatística da validação dos modelos projetados para prever o crescimento de microalgas quando há influência de iluminância e <i>CM</i>	88
Tabela 19 - Análise estatística das ANNs para todas as configurações e otimizações.	92
Tabela 20 - Parâmetros estimados para o modelo proposto e a equação de Pirt (Pirt, 1965).	101
Tabela 21 - Avaliação estatística para o modelo proposto e modelo de Pirt para prever o consumo de substrato e para a validação.	102
Tabela 22 - Identificação dos pigmentos obtidos por meio do processo fermentativo da levedura <i>P. rhodozyma</i>	105
Tabela 23 - Caracterização quantitativa dos carotenoides produzidos pela <i>P. rhodozyma</i> em 168h de fermentação.	110
Tabela 24 - Comparação de diferentes técnicas de extração de carotenoides.....	111
Tabela 25 - Parâmetros estimados para cada modelo estudado.	112
Tabela 26 - Avaliação estatística de cada equação proposta no modelo projetado para prever o crescimento e consumo de substrato da levedura <i>P. rhodozyma</i>	115
Tabela 27 - Avaliação estatística da validação dos melhores modelos para predição do crescimento e consumo de substrato da levedura <i>P. rhodozyma</i>	115
Tabela 28 - Equações utilizadas para a determinação do produto.	117
Tabela 29 - Parâmetros utilizados e os estimados para cada modelo estudado.	118
Tabela 30 - Análise estatística para os modelos de predição de obtenção de carotenoides totais.	119
Tabela 31 - Análise estatística da validação dos melhores modelos estudados.	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais rotas de formação de produtos de fermentação a partir do piruvato. Os números entre parênteses são os valores de oxidação calculados com base no número de átomos de oxigênio presentes nas estruturas.....	24
Figura 2 - Principais características de uma célula microalgal típica.	27
Figura 3 - Principais características de uma levedura típica.	30
Figura 4 - Faixa ótima de temperatura para reações enzimáticas.....	34
Figura 5 - Exemplo de uma rede neuronal artificial com 5 entradas, 10 neurônios na camada oculta e 3 saídas.....	42
Figura 6 - Exemplificação da estrutura de um neurônio de entrada única.	43
Figura 7 - Arquitetura de uma das redes neuronais artificiais utilizada, com 4 variáveis de entrada, uma camada oculta com 5 neurônios e 4 variáveis de saída.....	64
Figura 8 - Esquema simplificado de entradas e saídas para o balanço de massa e energia do metabolismo microbiano.	68
Figura 9 - Curva cinética de crescimento de microrganismos (a) curva tradicional (b) curva linearizada.....	70
Figura 10 - Curva cinética de consumo de substrato (a) curva tradicional (b) curva linearizada.	70
Figura 11 - Etapas iniciais da extração: (a) biomassa e adição de pérolas de vidro (b) biomassa acrescida do solvente e (c) biomassa e extrato após a etapa de centrifugação.....	75
Figura 12 - Etapas da lavagem do extrato: (a) Etapa inicial, separação de fases. (b) Extrato puro.....	76
Figura 13 - Comparação entre os dados experimentais e as Equações 2 e 33 para a cinética de crescimento de microalgas sem aplicação de CM	85
Figura 14 - Comparação entre os dados experimentais e as Equações 2 e 33 para a cinética de crescimento de microalgas com aplicação de CM de 30 mT.....	85
Figura 15 - Comparação entre os dados experimentais e as Equações 2 e 33 para a cinética de crescimento de microalgas com aplicação de CM de 60 mT.....	86
Figura 16 - Comparação entre os dados experimentais e as equações 47 e equação de Verhulst (Equação 2) para o crescimento da microalga com aplicação de CM de 30 mT.....	89
Figura 17 - Comparação entre os dados experimentais e as equações 47 e equação de Verhulst (Equação 2) para o crescimento da microalga sem aplicação de CM	89
Figura 18 - Performance da ANN para as melhores configurações das redes.	94
Figura 19 - Valores previstos de dados normalizados versus dados experimentais normalizados usando otimização LM com uma única camada oculta e 5 neurônios.	96
Figura 20 - Valores previstos de dados normalizados versus dados experimentais normalizados usando otimização BR com uma única camada oculta e 10 neurônios.	97
Figura 21 - Valores previstos de dados normalizados versus dados experimentais normalizados usando otimização LM com duas camadas ocultas [15 5].	98
Figura 22 - Valores previstos de dados normalizados versus dados experimentais normalizados usando otimização BR com duas camadas ocultas [10 15].	99
Figura 23 - Comparação entre os dados experimentais, modelo proposto e equação de Pirt, para a cinética de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> para a validação do modelo (experimento 2), utilizando-se a equação de Monod para o crescimento.	103
Figura 24 - Comparação entre os dados experimentais, modelo proposto equação de Pirt, para a cinética de consumo de substrato de <i>S. Cerevisiae</i> para a validação do modelo (experimento 2), utilizando-se a equação de Monod para o crescimento.....	103

Figura 25 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de <i>Phaffia rhodozyma</i> para 168 h de fermentação.	106
Figura 26 - Via metabólica partindo do acetil - CoA até a formação da astaxantina para a espécie de levedura <i>P. rhodozyma</i>	108
Figura 27 - Possível via metabólica partindo-se do Acetil – CoA até a formação de β – caroteno para o processo fermentativo em estudo utilizando a <i>P. rhodozyma</i>	109
Figura 28 - Comparação entre os dados experimentais do crescimento da levedura <i>P. rhodozyma</i> e o modelo de crescimento determinado pela equação de Contois em combinação com as equações de consumo de substrato de Pirt e o modelo proposto.	116
Figura 29 - Comparação entre os dados experimentais do consumo de substrato da levedura <i>P. rhodozyma</i> e os modelos de consumo de substrato de Pirt e o modelo proposto, utilizando-se a equação de Contois para o modelo de crescimento.	116
Figura 30 - Comparação entre os dados experimentais da obtenção de produtos pela levedura <i>P. rhodozyma</i> e os modelos de Luedeking e Piret e Ghose e Tyag.	120
Figura A.1 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de <i>Phaffia rhodozyma</i> para 24 h de fermentação para o experimento 1.....	137
Figura A.2 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de <i>Phaffia rhodozyma</i> para 48 h de fermentação para o experimento 1.....	137
Figura A.3 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de <i>Phaffia rhodozyma</i> para 72 h de fermentação para o experimento 1.....	138
Figura A.4 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de <i>Phaffia rhodozyma</i> para 96 h de fermentação para o experimento 1.....	138
Figura A.5 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de <i>Phaffia rhodozyma</i> para 120 h de fermentação para o experimento 1.....	139
Figura A.6 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de <i>Phaffia rhodozyma</i> para 144 h de fermentação para o experimento 1.....	139
Figura A.7 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de <i>Phaffia rhodozyma</i> para 168 h de fermentação para o experimento 1.....	140
Figura A.8 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de <i>Phaffia rhodozyma</i> para 24 h de fermentação para o experimento 2.....	140
Figura A.9 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de <i>Phaffia rhodozyma</i> para 48 h de fermentação para o experimento 2.....	141
Figura A.10 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de <i>Phaffia rhodozyma</i> para 72 h de fermentação para o experimento 2.....	141
Figura A.11 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de <i>Phaffia rhodozyma</i> para 96 h de fermentação para o experimento 2.....	142
Figura A.12 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de <i>Phaffia rhodozyma</i> para 120 h de fermentação para o experimento 2.....	142
Figura A.13 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de <i>Phaffia rhodozyma</i> para 144 h de fermentação para o experimento 2.....	143
Figura A.14 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de <i>Phaffia rhodozyma</i> para 168 h de fermentação para o experimento 2.....	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIC	Critério de informação Akaike (do inglês, <i>Akaike Information Criteria</i>)
ADP	Adenosina difosfato
ANN	Redes neuronais artificiais (do inglês, <i>Artificial Neural Network</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
CM	Campo magnético
CME	Campo magnético estático
DF	Graus de Liberdade (do inglês, <i>Degrees of Freedom</i>)
DP	Dormand-Prince
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS)
ED	Equação diferencial
EDO	Equação diferencial ordinária
FES	Fermentação em estado sólido
F _{obj}	Função objetivo
FS	Fermentação submersa
IC	Intervalo de confiança
MeOH	Metanol
MTBE	Metanol/éter metil-terbutil
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NE	Número de experimentos
NLLS	Mínimos quadrados não lineares (do inglês, <i>Non-Linear Least Square</i>)
NP	Número de parâmetros
NY	Número de variáveis de estado medidas
P	Fosfato
PSO	Otimização de enxame de partículas (do inglês, <i>Particle – Swarm Optimization</i>)
R ²	Coefficiente de determinação
RK	Runge-Kutta
SSE	Soma dos Quadrados dos Erros (do inglês, <i>Sum of Squared Errors</i>)
U	Ultrassom
YM	Yeast malt

LISTA DE SÍMBOLOS

A_1	Constante relacionada a formação de compostos ativos que impulsionam o processo	-
A_2	Constante relacionada a formação de compostos ativos que impulsionam o processo	-
E_a	Energia de ativação	kJ
E_b	Energia de ativação	kJ
I	Iluminância	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
I_0	Irradiância absorvida	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
I'_0	Irradiância externa	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
I_{av}	Irradiância media dentro do cultivo	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
I_g	Saturação de luz	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
I_k	Análogo ao K_s	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
I'_k	Irradiância constante	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
I_{max}	Irradiância máxima	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
k_d	Taxa constante de crescimento no escuro	dia^{-1}
k_p	Taxa fotossintética	dia^{-1}
K_1	Constante cinética	-
K_2	Constante cinética	-
K_i	Afinidade da microalga à iluminância	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
K_I	Constante de inibição pelo substrato	g L^{-1}
K_M	Afinidade da microalga ao campo magnético	mT
K_{MI}	Inibição de crescimento por campo magnético	mT
K_s	Constante de saturação do substrato (afinidade ao substrato)	g L^{-1}
K_S	Constante de saturação à luz	$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$
m	Coefficiente de manutenção	-
n	Parâmetro de forma	-
n_2	Parâmetro de forma	-
P	Concentração de Produto	g L^{-1}
P_m	Concentração máxima de produto em que não ocorre morte celular	g L^{-1}
R	Número de medições de variáveis de estado	-
R_p	Respiração de microalga	-
S	Concentração de substrato	g L^{-1}
T	Temperatura	$^{\circ}\text{C}$
$[H^+]$	Concentração de prótons no meio	$^{\circ}\text{C}$
X	Concentração de biomassa	g L^{-1}
X_e	Dados experimentais	-
X_{max}	Concentração máxima de biomassa	g L^{-1}
X_s	Dados simulados	-
$Y_{X/S}$	Rendimento do crescimento microbiano em relação ao consumo do substrato	-
$Y_{P/X}$	Rendimento da obtenção do produto em relação ao crescimento microbiano	-

Letras gregas

α	Constante de proporcionalidade	-
α_1	Derivada da taxa fotossintética	-
α_2	Constante de proporcionalidade	-
β	Constante de proporcionalidade	-
μ	Taxa de crescimento específica	dia ⁻¹
μ_G	Taxa de crescimento saturada de luz	dia ⁻¹
μ_P	Taxa de formação de produto	dia ⁻¹
μ_S	Taxa de consumo de substrato	dia ⁻¹
$\mu_{max,x}$	Taxa máxima de crescimento específica	dia ⁻¹
$\mu_{max,s}$	Taxa máxima de consumo de substrato	dia ⁻¹

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. OBJETIVOS.....	20
1.1.1. Objetivo Geral	20
1.1.2. Objetivos específicos	20
1.2. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. PROCESSOS FERMENTATIVOS.....	23
2.1.1. Tipos de Processos Fermentativos	25
2.2. MICRORGANISMOS FERMENTATIVOS.....	26
2.2.1. Microalgas	26
2.2.2. Leveduras	29
2.3. METABOLISMO EM PROCESSOS FERMENTATIVOS.....	32
2.3.1. PARÂMETROS DE INFLUÊNCIA	33
2.4. MODELAGEM MATEMÁTICA EM BIOPROCESSOS.....	39
2.4.1. Classificação de modelos matemáticos de processos fermentativos	41
2.5. MODELOS CINÉTICOS PARA CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS.....	44
2.5.1. Modelos gerais para taxa de crescimento	44
2.5.2. Modelos para microrganismos fotossintetizantes	47
2.5.3. Modelo para cinética de consumo de substrato	50
2.5.4. Modelos cinéticos para obtenção de produto	51
2.6. INTEGRAÇÃO NUMÉRICA.....	52
2.6.1. Método de Euler	52
2.6.2. Método de Runge – Kutta	53
2.6.3. Método Dormand – Prince	54
2.7. ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS.....	54
2.7.1. Otimização por enxame de partículas (PSO)	56
2.7.2. Trust – Region – Reflexive	57
2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
3. MATERIAIS E MÉTODOS	59
3.1. ESTUDO DE CASO 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO USO DE CAMPO MAGNÉTICO NO CRESCIMENTO DA MICROALGA <i>Spirulina sp.</i>	59
3.1.1. Microrganismo e Condições de Cultivo	59
3.1.2. Modelo Matemático	60
3.2. ESTUDO DE CASO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO USO DE CAMPO MAGNÉTICO NO CRESCIMENTO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	63
3.2.1. Microrganismo e condições de cultivo	63
3.2.2. Modelo matemático	63
3.3. ESTUDO DE CASO 3 – MODELOS MATEMÁTICOS PARA CONSUMO DE SUBSTRATO.....	67
3.3.1. Microrganismo e condições de cultivo	67
3.3.2. Construção do modelo matemático para consumo de substrato	67
3.4. ESTUDO DE CASO 4 – MODELOS MATEMÁTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA OBTENÇÃO DE PRODUTOS METABÓLICOS.....	73
3.4.1. Obtenção da levedura <i>Phaffia rhodozyma</i> e ativação do microrganismo ...	73
3.4.2. Curva padrão	73
3.4.3. Condições de cultivo	74
3.4.4. Determinação de açúcares totais	74
3.4.5. Extração de carotenoides	75

3.4.6.	Quantificação e identificação dos carotenoides	76
3.4.7.	Modelos matemáticos para curva de crescimento e consumo de substrato	77
3.4.8.	Modelos matemáticos para obtenção de bioprodutos	78
3.4.9.	Integração numérica e estimação dos parâmetros	79
4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	81
4.1.	ESTUDO DE CASO 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO USO DE CAMPO MAGNÉTICO NO CRESCIMENTO DA MICROALGA <i>Spirulina</i> sp.	81
4.1.1.	Efeito simultâneo do campo magnético e da iluminância	81
4.1.2.	Efeito da inibição pelo campo magnético	86
4.2.	ESTUDO DE CASO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO USO DE CAMPO MAGNÉTICO NO CRESCIMENTO DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
4.2.1.	Redes neuronais artificiais (ANN)	91
4.3.	ESTUDO DE CASO 3 – MODELOS MATEMÁTICOS PARA DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE SUBSTRATO	101
4.3.1.	Avaliação dos modelos matemáticos para o consumo de substrato	101
4.4.	ESTUDO DE CASO 4 – MODELOS MATEMÁTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA OBTENÇÃO DE PRODUTOS METABÓLICOS	105
4.4.1.	Carotenoides: extração e identificação dos pigmentos	105
4.4.2.	Modelagem matemática para o crescimento e consumo de substrato	112
4.4.3.	Modelagem matemática para a obtenção do produto	117
5.	CONCLUSÃO	121
	REFERÊNCIAS	123
	APÊNDICE A	137

1. INTRODUÇÃO

Os modelos matemáticos de processos fermentativos são uma tentativa de representar matematicamente o que ocorre em tais processos (BONOMI; SCHMIDELL, 2001; FREDRICKSON; MEGEE III; TSUCHIY, 1970; KOUTINAS et al., 2012; MATA-ALVAREZ et al., 2009; TORRES; SANTOS, 2015). Tal metodologia quando empregada, apresenta diversas vantagens, como auxílio no controle do processo, redução de custos e melhoramento na qualidade do produto (SILVEIRA; MAZUTTI; SALAU, 2016).

O metabolismo microbiano, bem como seu crescimento, é diretamente dependente das condições as quais estão submetidos, principalmente dos fatores externos (FENCL, 1966). Em se tratando de processos fermentativos, há uma escassez de modelos específicos para descrever e prever o processo mediante às diversas modificações realizadas para melhorar o desempenho do sistema, tais como o uso de campos magnéticos, ultrassom, incidência de luz, micro-ondas e diversas outras maneiras que visam melhorar a performance do processo. Dessa maneira, o estudo de modelos matemáticos capazes de computar a influência desses fatores externos torna-se uma ferramenta de grande auxílio para predizer o processo fermentativo de forma mais fidedigna.

A literatura relata poucas equações que agregam os fatores externos que afetam o processo fermentativo. Comumente, para descrever e prever o comportamento dos microrganismos diversos autores utilizam os modelos clássicos, como Monod (1942) e Contois (1959), baseando-se apenas na influência do consumo de substrato primordial. Contudo, tais modelos nem sempre são suficientes para descrever processos que sofrem influência de fatores externos ao cultivo, como incidência de luz, temperatura, aplicação de campos magnéticos, ultrassom, entre outros.

Alguns autores como Aiba (1982), Bannister (1979) e Grima et al. (1993 e 1996) descreveram equações matemáticas relacionando a influência da incidência luminosa no crescimento de microrganismos fotossintetizantes. Entretanto, tais equações não se aplicam para processos em que a incidência luminosa é constante. Em outro estudo, Pérez et al. (2008), escreveram um modelo simples para expressar a influência do pH no crescimento de microalgas, entretanto, seu modelo não agrega a influência da luminosidade ao processo. Sánchez et al. (2008), propuseram um modelo global para crescimento de microalgas, no qual considera a influência da irradiância e da temperatura, mas não consegue prever como o substrato afeta o sistema.

Portanto, há uma lacuna na literatura com relação a modelos matemáticos que possam prever o crescimento do microrganismo, além de descrever também os fatores externos, conforme mencionado anteriormente. Outro ponto que não apresenta muito esclarecimento, são as equações que possam descrever uma maneira melhor sobre como ocorre o consumo de substrato. A equação mais comumente utilizada para tal, é datada de 1965, a equação de Pirt, que utiliza o rendimento do processo em relação ao crescimento e consumo de substrato para equacionar o processo. Deixando então, pouca explicação a respeito de como ocorre a interação entre microrganismo e substrato.

Dessa maneira, como a modelagem matemática tem o intuito de analisar e caracterizar as interações entre o microrganismo/habitat/tipo de processo fermentativo, torna-se importante explorar modelos que consigam de alguma forma agregar a influência e o impacto desses fatores externos ao processo como um todo, sejam eles aplicados de forma constante ou não.

O presente trabalho tem o intuito de preencher essa lacuna na literatura por meio de estudos de casos que envolvem processos fermentativos, aplicando estratégias matemáticas para melhorar a predição dos processos estudados.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho é estudar a modelagem de processos fermentativos com diferentes microrganismos, avaliando a influência das condições de cultivo para o crescimento, consumo de substrato e obtenção de produtos.

1.1.2. Objetivos específicos

- ✓ Estudar modelos matemáticos descritos na literatura e propor um modelo matemático mais adequado para a descrição e previsão da influência da iluminância e do campo magnético para crescimento de microalga *Spirulina* sp.;
- ✓ Avaliar por meio de modelos matemáticos o efeito de inibição por campo magnético no crescimento *Spirulina* sp.;
- ✓ Modelar e analisar o efeito do campo magnético em cultivos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* por meio de redes neuronais artificiais;

- ✓ Investigar a interação entre microrganismo e substrato de modo a descrevê-la matematicamente;
- ✓ Produzir carotenoides por fermentação de *Phaffia rhodozyma*, extraí-los através extração exaustiva com combinação de solventes e identificá-los por meio de cromatografia;
- ✓ Estudar modelos matemáticos descritos na literatura que sejam mais adequados para descrever e prever o crescimento, consumo de substrato e produção de carotenoides por meio da levedura *Phaffia rhodozyma*.

1.2. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é dividida em 6 capítulos.

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO

O capítulo de Introdução apresenta a proposta e a justificativa do trabalho, assim como a explanação do tema escolhido e seus objetivos

Capítulo 2 – REVISÃO DE LITERATURA

Apresenta as principais referências bibliográficas utilizadas para o estudo da pesquisa. A revisão aborda os processos fermentativos e microrganismos estudados, bem como os modelos matemáticos para a cinética dos processos fermentativos. Além de fazer referência a importância da modelagem matemática em processos fermentativos.

Capítulo 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

São apresentados os estudos de caso analisados com as metodologias empregadas para atingir os objetivos propostos, justificadas pela literatura.

Capítulo 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este capítulo traz os resultados obtidos para cada estudo de caso, cada um apresentando sua particularidade em análise.

Capítulo 5 – CONCLUSÕES

O último capítulo da dissertação apresenta as principais conclusões obtidas, de um modo geral e para cada estudo de caso analisado, contendo também sugestões para trabalhos futuros.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PROCESSOS FERMENTATIVOS

Os processos fermentativos são conhecidos e utilizados pelo homem desde os primórdios da civilização, sendo estes tão antigos quanto a agricultura. A produção de produtos oriundos da fermentação, como cerveja, vinho, pão e vinagre já era de domínio de civilizações passadas, como egípcios, sumérios, gregos e romanos (BOGSAN; NERO; TODOROV, 2015; EL-MANSI et al., 2012; MOULTON, 2014; NAJAFPOUR, 2007; PRAJAPATI; NAIR, 2008; RAY; JOSH, 2015).

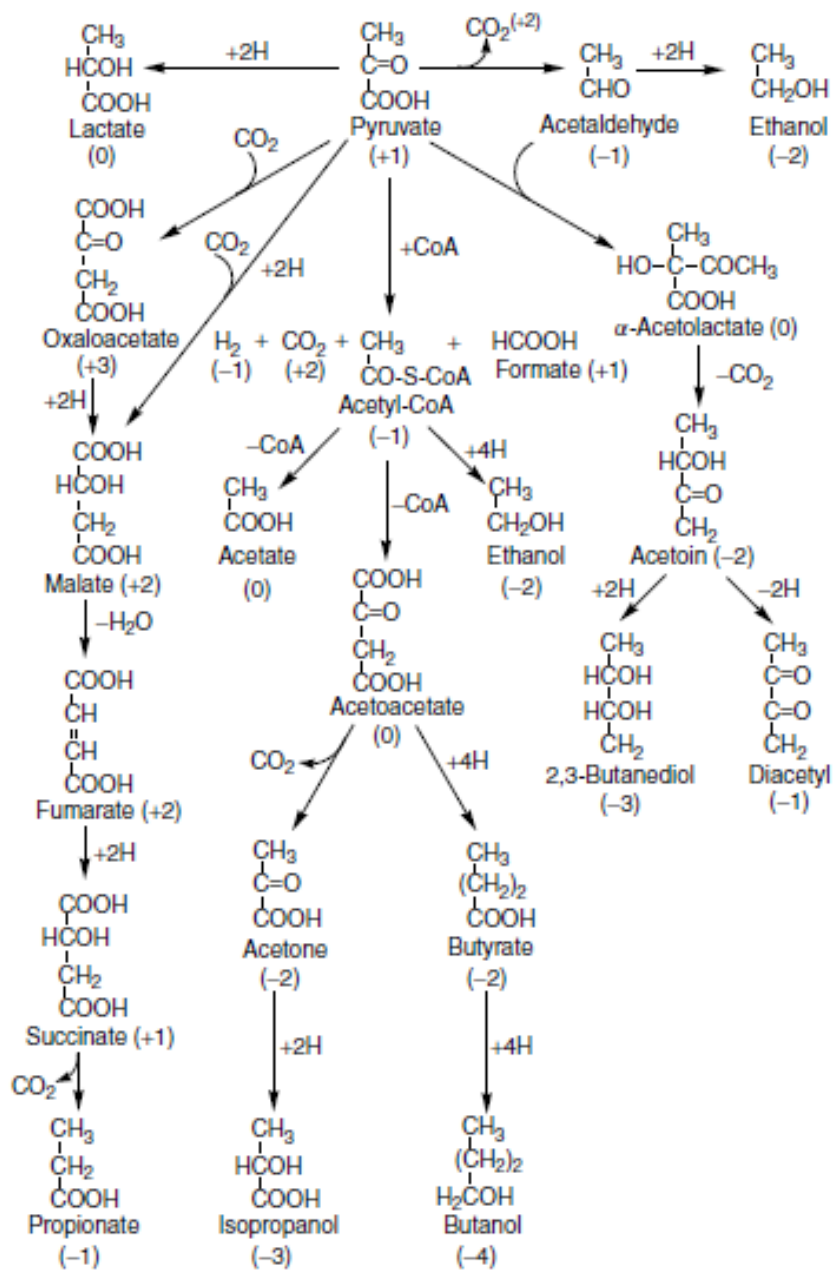
A fermentação, como é comumente denominado o processo fermentativo, trata-se de um catabolismo anaeróbio, no qual há doação e aceitação de elétrons por parte de um composto orgânico. Portanto, nada mais é do que um processo redox, no qual ocorre a oxidação e redução de um substrato, desempenhando papel importante no metabolismo fermentativo de carboidratos (FUNKE; CASE, 2012; MADIGAN et al., 2016; MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002; RAY; JOSH, 2015).

De acordo com Gottschalk (1979), Nielsen; Villadsen; Lidén (2003) e White et al. (2012), uma definição mais apropriada para o processo fermentativo, é defini-lo como uma maneira de reoxidação do NADH (dinucleótido de nicotinamida e adenina), ou outro aceptor de elétrons reduzido (que foi gerado pelas reações de oxirredução), por meio de metabólitos produzidos pela via metabólica.

Diversas vias metabólicas e suas variações, podem ser utilizadas pelos microrganismos, fazendo com que os produtos gerados durante a fermentação possam ser derivados do piruvato ou outros intermediários das vias, conforme mostrado na Figura 1.

Dessa maneira, com a possibilidade de seguir diversas vias metabólicas, os processos fermentativos são usados para a obtenção de ampla variedade de produtos, cada qual oriundo de processos distintos, como obtenção de células ou biomassa microbiana, enzimas, proteínas, lipídeos, álcoois, ácidos, vitaminas, antibióticos e diversos produtos metabólicos (COWAN; TALARO, 2006; NIELSEN; VILLADSEN; LIDÉN, 2003; RAY; JOSH, 2015; STANBURY; WHITAKER; HALL, 2003), conforme mostra a Tabela 1.

Figura 1 - Principais rotas de formação de produtos de fermentação a partir do piruvato. Os números entre parênteses são os valores de oxidação calculados com base no número de átomos de oxigênio presentes nas estruturas.



Fonte: (Moat; Foster; Spector, 2002).

Tabela 1 - Microrganismos e seus produtos oriundos de processos fermentativos.

Microrganismo	Produto
<i>Lactobacilos</i>	Ácido lático
<i>Aspergillus</i>	α -amilase
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol
<i>Rhodotorula</i>	Lipase
<i>Penicillium</i>	Pectinase
<i>Propionibacterium</i>	Ácido propiônico
<i>Acetobacter</i>	Ácido acético

2.1.1. Tipos de Processos Fermentativos

Há dois tipos distintos de processos fermentativos, que diferem pela maneira como são realizados: a fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES). Ambos os processos fermentativos apresentam suas particularidades e, são indicados de acordo com o microrganismo a ser utilizado e, com o produto desejado.

A FS ou fermentação líquida, como também pode ser denominada, é caracterizada pelo uso de meio de cultura líquido, o qual irá conter a demanda nutricional dos microrganismos. Este processo facilita o controle da operação como: transferência de calor e massa, difusividade gasosa, temperatura, umidade, pH, disponibilidade de nutrientes, além de possibilitar a automação do processo. Contudo, como há um elevado teor de umidade, as chances de contaminação são grandes e, em alguns processos, os produtos oriundos da fermentação podem estar diluídos demais, necessitando de uma etapa de concentração (BARRAGÁN et al., 2016; MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2006; PANDEY; SOCCOL; LARROCHE, 2008; PRABHAKAR et al., 2008; VINIEGRA-GONZALEZ, 2013).

Por outro lado, a FES, envolve o crescimento de microrganismos em partículas sólidas úmidas (BHARGAV et al., 2008; CHEN, 2013; LIU et al., 2014; PANDEY; SOCCOL; LARROCHE, 2008; PRABHAKAR et al., 2008; VINIEGRA-GONZALEZ, 2013; SINGHANIA et al., 2017). Trata-se de um processo que envolve ausência total ou parcial de água livre, de forma a garantir umidade suficiente para assegurar o crescimento do microrganismo e seu metabolismo. Há o emprego de uma matriz sólida, tida como substrato ou suporte impregnado de nutrientes que atua como fonte de energia ou um substrato inerte para suporte. Essa matriz possui seu conteúdo líquido mantido em nível correspondente à atividade

de água, nunca excedendo a capacidade máxima de retenção de umidade (LARROCHE, 2008; LIU et al., 2014; MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2006; PANDEY; SOCCOL; NIGAM; PANDEY, 2009; SINGHANIA et al., 2017; VINIEGRA-GONZALEZ, 2013).

Diferentemente da FS, a FES tem por finalidade simular o habitat natural de microrganismos, uma vez que muitos desses crescem e desenvolvem-se de maneira melhor em condições de FES do que condições submersas (CHEN, 2013; NIGAM; PANDEY, 2009; PANDEY, 2003; SINGHANIA et al., 2009; SINGHANIA et al., 2017). Entretanto, mesmo simulando o habitat natural, na FES o controle das condições de operação do processo é relativamente implexo, ou seja, o controle do processo é complexo (BARRAGÁN et al., 2016; BHARGAV et al., 2008; MITCHELL; BEROVIC; KRIEGER, 2006; PANDEY; SOCCOL; LARROCHE, 2008; PRABHAKAR et al., 2008; VINIEGRA-GONZALEZ, 2013,).

2.2.MICROORGANISMOS FERMENTATIVOS

Os componentes primordiais de um processo fermentativo são constituídos pelo microrganismo e pelo substrato (BAMFORTH, 2005; STANBURY et al., 2003). Tais componentes apresentam fator determinante para a direção e formação do produto final.

2.2.1. Microalgas

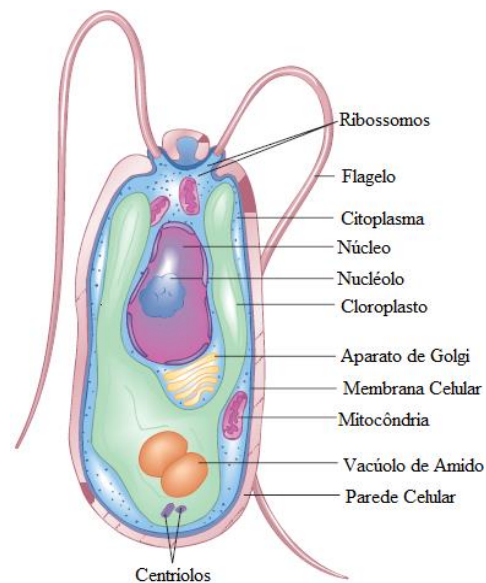
Microalgas são microrganismos unicelulares, aquáticos, podendo viver em água doce ou salina, capazes de converter energia luminosa em energia química por meio de fotossíntese (BRENNAN; OWENDE, 2010; CHISTI, 2007; DERMIBRAS; DERMIBRAS, 2010; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; PIENKOS; DARZINS, 2009; PRIYADARSHANI; RATH, 2012). Filogeneticamente, podem ser eucariontes ou procariontes (OLAIZOLA, 2003). Esses microrganismos são aptos para a fixação de dióxido de carbono, apresentam crescimento rápido e elevada produção de biomassa, sendo capazes de crescer sob condições adversas (BRENNAN; OWENDE, 2010; CHISTI, 2007; DERMIBRAS; DERMIBRAS, 2010; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; PIENKOS; DARZINS, 2009; PRIYADARSHANI; RATH, 2012). A Figura 2 representa as características básicas de uma célula microalgal (TALARO; TALARO, 2002), embora suas características físicas variem de acordo com a espécie.

Apresentando então, capacidade de adaptação, para cultivá-las é necessário apenas uma fonte de carbono (como dióxido de carbono atmosférico), incidência de luz - para que seja realizada a fotossíntese -, e nutrientes como nitrogênio, fósforo, potássio, ferro, enxofre,

molibdênio, magnésio, cálcio, cloro, zinco, cobre, manganês, cobalto e boro, que são imprescindíveis para a biossíntese (LARSDOTTER, 2006; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014).

Entretanto, mesmo apresentando uma simplicidade em relação à demanda nutricional e à facilidade de adaptação a diversas condições de cultivo, esses microrganismos possuem metabolismo bastante complexo. Apresentam a capacidade de desacoplar o metabolismo de carbono do metabolismo energético conforme a disponibilidade energética/luminosa e de nutrientes. Dessa forma, são aptas a crescer autotroficamente, isto é, utilizando-se a fotossíntese, a qual converte luz em energia química; heterotroficamente, por meio de compostos orgânicos como fonte de carbono e de energia; ou ainda sob regime mixotrófico, onde utilizam a luz como fonte de energia e compostos orgânicos como fonte de carbono (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Figura 2 - Principais características de uma célula microalgal típica.



Fonte: (TALARO TALARO, 2002 adaptada).

O cultivo de microalgas visa a obtenção de biocompostos, tais como aditivos alimentares, obtenção de carotenoides e vitaminas, e até mesmo biocombustíveis, produtos estes obtidos através da extração da biomassa produzida (ANDRADE; COSTA, 2008).

2.2.1.1. *Spirulina*

Dentre as microalgas existentes, a *Spirulina* é uma cianobactéria filamentosa que faz parte de um grupo de algas azuis-verdes, são multicelulares, fotossintetizantes e filamentosas, que crescem em ambientes aquáticos. Destacam-se dentre as demais microalgas, uma vez que, são alvo de estudos da indústria de alimentos, devido ao seu elevado teor proteico e de vitaminas (HABIB et al., 2008; SARANRAJ; SIVASAKTHI, 2014, SONI; SUDHAKAR; RANA, 2017; USHARANI; SARANRAJ; KANCHANA, 2012).

O principal pigmento fotossintético produzido por elas é a ficocianina, de coloração azul. Há também a produção de clorofila e alguns carotenoides. Sua característica morfológica marcante é a presença de filamentos (HABIB et al., 2008).

Devido ao elevado teor proteico e à produção de ficocianina e, também, por suas diversas aplicações nos setores industriais, como a indústria de alimentos e a farmacêutica (GHAENI; ROOMIANI, 2016), esta microalga é alvo de diversos estudos com diversas condições de cultivo e obtenção de diversos produtos.

El-Baky e El-Baroty (2016) estudaram diversas concentrações de nitrogênio (sob a forma de NaNO_3 , em concentrações de 1,25; 2,50 e 5,00 g L^{-1}) para o cultivo de *Spirulina maxima* para quantificar a l-asparginase. Nestes experimentos, as maiores concentrações de nitrogênio (5,00 g L^{-1}) proporcionaram maior produção da enzima quando comparadas com as demais concentrações. Em contrapartida, Li et al. (2018) estudaram a limitação de nitrogênio no cultivo de *Spirulina platensis* em cultivos mixotróficos e autotróficos. Neste estudo, utilizaram-se o meio Zarrouk modificado (utilizando-se a metade da concentração de nitrogênio). Dessa forma, constataram que, a limitação gradativa de nitrogênio faz com que o microrganismo aumente a produção de biomassa e de carboidratos, de modo que, em cultivos mixotróficos a concentração de biomassa chegou a 5294 mg L^{-1} e, nos autotróficos em apenas 2940 mg L^{-1} .

Testes com diferentes fontes luminosas foram estudados por Vo et al. (2017). Os autores testaram luzes de LED nas cores: azul (455 – 492 nm), vermelho (622 – 780 nm) e branca. Neste estudo, eles descobriram que as luzes vermelha e branca colaboram mais para o crescimento e biossíntese de produtos como carotenoides e lipídios, quando comparados à luz azul. Ho et al. (2018) também estudaram diferentes condições de luminosidade e fotoperíodo (claro/escuro, 45:15, 30:30, 15:45), utilizando-se LEDs monocromáticos – branco (410 – 610 nm), vermelho (600 – 690 nm) e azul (435 – 515 nm) e lâmpadas fluorescentes (400 – 700 nm). Os ensaios indicaram que, o LED branco em fotoperíodo de 30:30 e suplementação de 45 mM

de nitrato, resultaram em maior produção de c-ficocianina, $101,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$, representando um aumento de 40% na produção quando comparada às lâmpadas fluorescentes.

Al-Dhabi e Arasu (2016) estudaram 37 variedades de *Spirulina* comerciais para avaliar o teor de ácidos graxos poli-insaturados, açúcares, aminoácidos livres e polifenóis, além de testarem seus potenciais biológicos. As análises realizadas por eles demonstraram que há presença de 13 ácidos graxos poli-insaturados, 7 açúcares, 18 aminoácidos livres e polifenóis.

Estudo realizado por Czerwonka et al. (2018) forneceu evidências de que produtos comerciais da *Spirulina* possuem atividade antitumoral contra células de câncer no pulmão, demonstrando que a *Spirulina* apresenta propriedades quimiopreventivas.

2.2.2. Leveduras

Leveduras são consideradas como sendo uma forma unicelular de fungos (ADAMS, 2004; HANSOM, 2008; MONTES DE OCA et al., 2016; SPEERS; FORBES, 2015; TAKAHASHI et al., 2017; WALKER; WHITE, 2005) e, apresentam-se sob as formas: esférica, oval ou cilíndrica (FELDMANN, 2012; SPEERS; FORBES, 2015; TAKAHASHI et al., 2017), cujo tamanho do diâmetro varia entre 5 – 10 μm (FELDMANN, 2012; SPEERS; FORBES, 2015; Montes de Oca et al., 2016). Reproduzem-se assexuadamente por brotamento ou por fissão (CARLILE; WATKINSON; GOODAY, 2001; MONTES DE OCA et al., 2016; SPEERS; FORBES, 2015; WALKER; WHITE, 2005). A Figura 3 representa as características típicas de uma célula de levedura, que constituem em núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndria, parede celular, membrana celular, vacúolo, complexo de Golgi e vesículas secretoras (FELDMANN, 2012; SPEERS; FORBES, 2015).

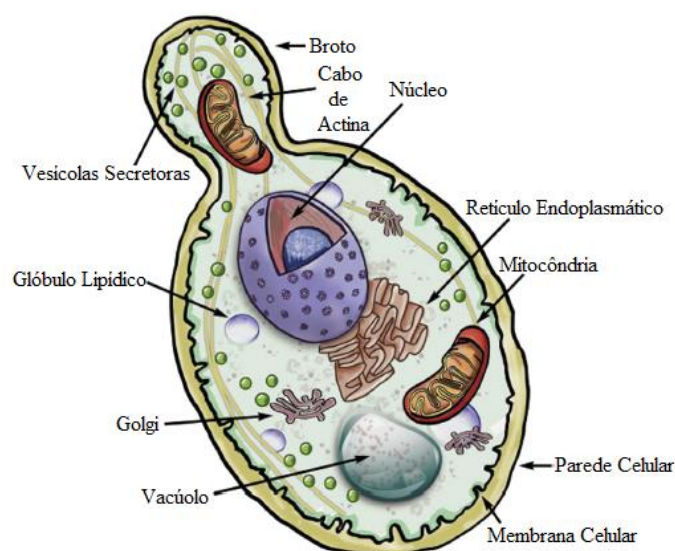
Leveduras são seres heterotróficos, que obtêm energia química sob a forma de ATP (trifosfato de adenosina) através do consumo de compostos orgânicos pelas diversas vias metabólicas. Dessa maneira, podem crescer de forma aeróbia, por meio da respiração, ou anaeróbia, realizando fermentação, de acordo com as condições ambientais nas quais estão inseridas e de acordo com a espécie em questão (FELDMANN, 2012; RODRIGUES; LUDOVICO; LEÃO, 2006).

A exigência nutricional desses microrganismos é relativamente simples, necessitam de uma fonte de açúcar fermentescível, ou seja, uma fonte de carbono tal como glicose, sacarose, frutose, galactose, maltose ou maltotriose. Necessitam, também, de uma fonte de nitrogênio, como ureia ou aminoácidos; de fosfato, cloreto e oxigênio e, em alguns casos, para o melhor desenvolvimento há a exigência de íons metálicos como K, Mg, Ca, Fe, Cu, Zn e Mn e, de

algumas vitaminas como, biotina, piridoxina, tiamina entre outras (BERRY; BROWN, 1987; SLAUGHTER, 2003).

Apresentando uma demanda nutricional relativamente simples e, podendo realizar metabolismo fermentativo, esses microrganismos são utilizados para obtenção de diversos produtos, que incluem desde alimentos fermentados e bebidas a produtos químicos e farmacêuticos. Produtos como, bioetanol, carotenoides, lipídios, ácidos orgânicos, vitaminas, polissacarídeos, bem como enzimas, podem ser obtidos por meio de processos fermentativos utilizando-se leveduras (BUZZINI; VAUGHAN-MARTINI, 2006).

Figura 3 - Principais características de uma levedura típica.



Fonte: (SPEERS; FORBES, 2015, adaptada).

2.2.2.1. *Phaffia rhodozyma*

O gênero de levedura *Phaffia*, é representado por *Phaffia rhodozyma* e, foi estipulado para representar as linhagens de leveduras isoladas no Japão e no Alasca na década de 60. Seu nome foi em homenagem a Herman Jan Phaff, em reconhecimento aos seus estudos sobre leveduras (MILLER; YONEYAMA; SONEDA, 1976; PHAFF, 1986A).

P. rhodozyma trata-se de uma levedura fermentativa produtora de carotenoides (MILLER; YONEYAMA; SONEDA, 1976). Apresenta potencial biotecnológico e interesse comercial por produzir majoritariamente astaxantina, um carotenoide de coloração laranja

rosado, que apresenta interessante valor econômico. Desse modo, estudos a respeito de processos fermentativos com esse microrganismo são realizados (ANDREWS; PHAFF; STARR, 1976; JOHNSON, 2003; PHAFF, 1986A; PHAFF, 1986B) com intuito de otimizar a obtenção de astaxantina.

As condições de cultivo afetam o crescimento da *P. rhodozyma* e a obtenção de astaxantina. Liu, Wu e Ho (2006) relacionaram a produção de carotenoides com fornecimento de oxigênio para cultivos submersos de *P. rhodozyma*, uma vez que, seus estudos indicam que há uma correlação linear entre a produção de carotenoides e a taxa de transferência de oxigênio no meio de cultivo. Já Huy et al. (2007) estudaram a influência da fonte de nitrogênio para o crescimento e biossíntese de astaxantina e, os resultados obtidos demonstram que a fonte de nitrogênio afeta significativamente o processo. A condição ótima para formulação do meio de cultivo obtida pelo estudo foi de $0,28 \text{ g L}^{-1}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $0,49 \text{ g L}^{-1}$ KNO_3 e $1,19 \text{ g L}^{-1}$ de extrato de carne bovina, condições estas que proporcionaram uma produção de astaxantina, em termos de volume de $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ e concentração de biomassa de $7,71 \text{ mg L}^{-1}$.

A otimização do meio de cultivo ocasiona maiores produções e maior produção de biomassa. Estudos realizados Schewe et al. (2017), conseguiram produção de 0,7 g de astaxantina por quilograma de meio de cultura utilizando-se *P. rhodozyma* em um processo batelada alimentada, após a otimização do meio de cultivo AXJ-20.

2.2.2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae foi descoberta em 1837 em malte e, seu nome científico quer dizer “fungo de açúcar”, em grego. O emprego deste microrganismo para produção de bebidas alcoólicas e pães reporta-se desde os povos sumérios e babilônios, por volta de 6000 a.C. (BRANDUARDI et al., 2012).

Este microrganismo vem sendo explorado e estudado há muitos anos devido ao seu potencial biotecnológico, como flexibilidade de cultivo, pela capacidade de ser tratada pelas técnicas genéticas clássicas (BRANDUARDI et al., 2012) e pela obtenção de diversos produtos metabólicos, tais como etanol, glutatona entre outros.

As condições de cultivo deste microrganismo são um fator determinante para o produto metabólico gerado. Nuanpeng et al. (2016), com o intuito de aperfeiçoar o processo de fermentação de açúcar para obtenção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, estudaram o processo de fermentação em um reator de coluna preenchida por esferas contendo células imobilizadas. Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que o reator de coluna com células

imobilizadas, após 6 h de tempo de retenção, apresentou produção de etanol de 16,7% v/v e consumo de açúcar de 88,2%, enquanto a fermentação descontínua em lote apresentou uma produção de etanol de 12,5% v/v e consumo de açúcar de 99,6%, após 27 h de processo. O reator proposto pelos autores possibilitou melhoria de 27% no rendimento e reduziu o tempo de fermentação.

Schmacht et al. (2017) estudaram uma taxa ótima de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de glutatona. Para isso os autores avaliaram a influência de diferentes composições do meio WMIX para a obtenção de biomassa e glutatona, além de estudarem diferentes estratégias de adição de cisteína. Os resultados obtidos por esses autores demonstram que, em fermentações contínuas, a adição contínua de cisteína ao sistema aumentou em 253% a produção de glutatona, quando comparado ao controle (sem adição de cisteína). Nugroho, Yoshikawa e Shimizu (2015) estudaram o efeito do estresse ácido em cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* por meio da utilização de ácido láctico (concentração de 10 ou 14 g L⁻¹) como agente acidulante. Dessa forma, os cultivos foram acrescidos de ácido láctico, com ou sem controle de pH inicial, a pH 6,0 e 2,5, respectivamente. Uma das avaliações acerca do estresse oxidativo realizada pelos autores foi a produção de glutatona e, os resultados mostraram que cultivos sob condições de pH baixo obtiveram um acúmulo do produto quando comparada a pH próximo da neutralidade (pH 6,0), o que demonstra que sob estresse ácido leva ao aumento de concentrações de glutatona por parte da levedura.

2.3. METABOLISMO EM PROCESSOS FERMENTATIVOS

Assim como qualquer outro organismo vivo, os microrganismos necessitam de nutrientes para se desenvolver e se reproduzir. A demanda nutricional, deve garantir o fornecimento de energia necessária para a realização das funções vitais, tais como, acúmulo e assimilação de nutrientes, facilidade de locomoção, reprodução, entre outros (BAMFORTH, 2005).

O metabolismo é uma soma de assimilações bioquímicas (vias anabólicas) e de dissimilação (vias catabólicas) de nutrientes pela célula. O crescimento de todo e qualquer microrganismo é um processo contínuo de interação entre as características do organismo e o habitat em que este está inserido (BERRY; BROWN, 1987).

A diversidade microbiana faz com que as demandas nutricionais sejam diferentes para cada grupo de microrganismos. Há microrganismos que crescem utilizando luz e dióxido de

carbono como fonte de energia ou outra fonte de carbono orgânico e, há outros que conseguem obter energia apenas por meio da oxidação de materiais inorgânicos (BAMFORTH, 2005).

Desse modo, com uma vasta fonte de nutrientes, os microrganismos são capazes de um extenso número de reações metabólicas (NAJAFPOUR, 2007). Em processos fermentativos, o metabolismo dos microrganismos apresenta certas similaridades, porém, não seguem o mesmo percurso, portanto, não são idênticos (NIELSEN; VILLADSEN; LIDÉN, 2003). Sendo assim, os fatores que influenciam o metabolismo dos microrganismos diferem entre suas espécies.

2.3.1. PARÂMETROS DE INFLUÊNCIA

O metabolismo microbiano, assim como seu crescimento, é dependente das condições ambientais às quais estão submetidos. Dessa forma, a taxa de crescimento é específica para cada microrganismo e, é dependente de fatores internos, como a capacidade e seus limites de crescimento, bem como de fatores externos, tais como substrato utilizado e condições de cultivo (FENCL, 1966). As condições de cultivo são afetadas por fatores físicos, tais como temperatura, pH, intensidade luminosa, aplicação de campos magnéticos, ultrassom, entre outros, bem como por fatores químicos, como a disponibilidade de nutrientes. Estes fatores podem ser capazes de auxiliar no processo de forma a beneficiá-lo ou, causar estresse de modo a inibi-lo.

2.3.1.1. Temperatura

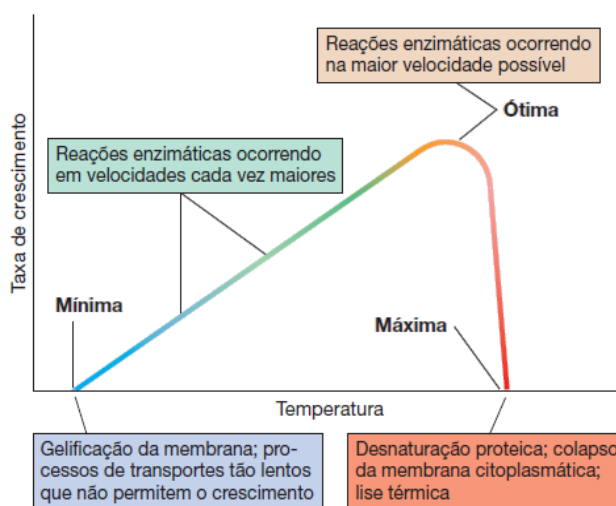
A temperatura é um fator primordial para o microrganismo, pois afeta diretamente seu crescimento e suas chances de sobrevivência. Cada espécie de microrganismo apresenta uma faixa ótima de temperatura, a qual possibilita o desenvolvimento do microrganismo sem lhe causar prejuízo ou danos.

A faixa ótima refere-se, então, a uma faixa de bom desempenho de crescimento e obtenção de produtos. Há uma faixa mínima que determina a temperatura mínima, de modo a não prejudicar o crescimento, a temperatura ótima, na qual o crescimento é favorecido e, uma temperatura máxima, que trata da maior temperatura que o processo pode suportar sem haver grandes danos (BRUSLIN, 2017; MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Dessa maneira, esse parâmetro afeta diretamente as reações biológicas, químicas e enzimáticas das células, fazendo com que seu aumento proporcione aumento na velocidade das reações e, como consequência, aumento no crescimento microbiano (BRUSLIN, 2017; MADIGAN et al., 2016).

O bom desempenho do processo está relacionado com a temperatura escolhida, havendo, então, a necessidade de se trabalhar na faixa ótima, visto que, se a temperatura for muito elevada ou muito baixa, será prejudicial para o microrganismo, conforme mostra a Figura 4 (BRUSLIN, 2017; MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Figura 4 - Faixa ótima de temperatura para reações enzimáticas.



Fonte: (MADIGAN et al., 2016).

2.3.1.2. pH

O pH, assim como a temperatura, afeta o processo fermentativo e também possui uma faixa ótima que proporciona as melhores condições de crescimento. Entretanto, diferentemente da temperatura, esta faixa é mais estreita (BAMFORTH, 2005; BRUSLIN, 2017; MADIGAN et al., 2016).

A maioria dos microrganismos crescem em pHs semelhantes ao seu pH interno, mantendo-se numa faixa de neutralidade entre 5,5 – 8,0. Entretanto, alguns microrganismos são aptos para crescerem em faixas de pH muito ácidas (acidófilos) ou muito básicas (alcalifílicos) (BRUSLIN, 2017; MADIGAN et al., 2016) e, independentemente do pH externo, o pH interno do microrganismo mantém-se neutro, para que seja evitada a desnaturação de macromoléculas celulares (MADIGAN et al., 2016).

2.3.1.3. *Nutrientes*

O requerimento nutricional dos microrganismos é vasto e difere de espécie para espécie. Entretanto, apresentam alguns elementos chave em comum: a necessidade de carbono, hidrogênio, nitrogênio e oxigênio, os chamados macronutrientes. Isto porque, tais elementos constituem os principais componentes celulares (BAMFORTH, 2005; BRUSLIN, 2017).

Embora os macronutrientes sejam necessários em maiores quantidades, há também a necessidade de ingestão de pequenas quantidades de outros elementos, como fósforo, enxofre, potássio, vitaminas e minerais (ferro, molibdênio, cobre, zinco), que são denominados elementos traço (BRUSLIN, 2017; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A demanda nutricional é responsável pela ocorrência da manutenção celular, pela formação de proteínas, ácido nucleico, fosfolipídios, enzimas, e pela produção de energia sob a forma de ATP (adenosina trifosfato), entre outras funções (BRUSLIN, 2017). Sendo assim, diversos estudos são realizados a fim de otimizar e reduzir os custos da composição de meio de cultura para os processos fermentativos.

2.3.1.4. *Intensidade Luminosa*

A intensidade luminosa, ou luminosidade, é de extrema importância para organismos fototróficos, isto é, microrganismos fotossintetizantes que utilizam radiação solar como fonte de energia para realizar a oxidação de moléculas inorgânicas e, para sintetizar moléculas orgânicas simples a partir de dióxido orgânico ou moléculas orgânicas simples (MADIGAN et al., 2016; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Esse processo é realizado em microrganismos como algas, cianobactérias e bactérias fotossintéticas (CHEN; NGUANG; CHEN, 2006; MADIGAN et al., 2016; MOAT; FOSTER; SPECTOR, 2002; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). A energia luminosa é, então, utilizada para converter ADP (difosfato adenosina) e P (fósforo) em ATP (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Microrganismos que realizam a fotossíntese necessitam de um fotoperíodo, ou seja, um período com iluminação e um período em ausência de luz. O fotoperíodo é necessário, pois o processo de fotossíntese acontece em duas etapas: a primeira que é dependente de luz, na qual energia luminosa é usada para converter ADP e P (fósforo) em ATP e, a segunda totalmente independente da luz que utiliza a ATP formada e elétrons para converter CO₂ em carboidratos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Entretanto, o crescimento desses microrganismos é comumente lento, devido à disponibilidade de luz (CHEN; NGUANG; CHEN, 2006; WEN; CHEN, 2003), isso porque acontece o sombreamento mútuo de células (WEN; CHEN, 2003). A penetração da luz nas células é inversamente proporcional à concentração celular (WEN; CHEN, 2003).

A luz é um fator limitante para microrganismos fotoautotróficos. A intensidade na qual esses cultivos são submetidos deve ser controlada, pois, acima do ponto de compensação da luz, a velocidade com que a fotossíntese acontece é diretamente proporcional à intensidade luminosa e, sob altas intensidades, pode ocorrer o fenômeno de fotoinibição (PULZ, 2001).

Luzi et al. (2019), por meio de simulações numéricas, avaliaram em um cultivo de *Chlamydomonas reinhardtii* os efeitos da mistura pneumática e a iluminação intermitente. De acordo com os resultados obtidos pelos autores, o uso de LEDs piscantes melhoraram produtividade de um fotobiorreator. Além do mais, concluíram que, selecionar um ciclo de trabalho auxilia para impedir a fotoinibição e, conseqüentemente, maximizar os efeitos da luz intermitente.

Lee et al. (2015) estudaram os efeitos do fotoperíodo em cultivos de consórcio alga – bactéria para redução de carga orgânica em águas residuais. Seus estudos determinaram que o tempo de exposição claro/escuro tem impacto notável na remoção de nutrientes, além de alternar a dinâmica da população em estudo.

O efeito do fotoperíodo claro/escuro para melhoramento de produção de biogás por meio de fotossíntese da *Chlorella sorokiniana* foi estudado por Meier et al. (2017). Seus resultados mostraram que, a maior eficiência de remoção de dióxido de carbono foi afetada pelos ciclos claro/escuro, bem como pela temperatura do processo.

Levasseur et al. (2018) estudaram o impacto na duração do fotoperíodo em culturas de *Chlorella vulgaris*, variando o ciclo de minuto a segundos. Os resultados encontrados pelos autores mostraram que fotoperíodos de segundos fazem com que essas microalgas cresçam mais rapidamente com menos unidades fotossintéticas, quando comparadas a cultivos com iluminação contínua.

2.3.1.5. Campo Magnético

O uso de campos magnéticos em cultivos de microrganismos é uma área pouco explorada e entendida em sua totalidade em bioprocessos (AFFAM; CHUNG; SWEE, 2018; BINHI; SAVIN, 2003; DINI; ABBRO, 2005; MOORE, 1979; TENG, 2005). Isso ocorre porque os dados experimentais ainda não são totalmente explicados fisicamente (BINHI;

SAVIN, 2003) restando várias lacunas a serem preenchidas e compreendidas (DINI; ABBRO, 2005).

A aplicação de campos magnéticos pode estimular ou inibir o crescimento do microrganismo e diversas atividades metabólicas. A forma como o campo irá atuar no processo, depende da força, da frequência e do tempo de sua aplicação (BARNES, 2005; MOORE, 1979; VELIZAROV, 1999).

A forma como o campo é produzido, seja por ímãs em forma de barras magnéticas, ou seja, por bobinas elétricas e solenoides, não faz diferença. Entretanto, sob determinadas condições, uma disposição e caracterização do aparato pode tornar-se mais eficiente (BARNOTHY, 1964).

Estudos comprovam que campos magnéticos estáticos (CME) com intensidade moderada podem agir em sistemas biológicos, principalmente no que diz respeito à membrana celular (ROSEN, 2003).

Tenuzzo et al. (2006) realizaram um estudo comparativo dos bio-efeitos ocasionados à exposição de CME de 6 mT em culturas de células em diferentes agentes de indução de apoptose. Os resultados demonstraram que o CME afetou todas as células examinadas e, os efeitos eram indiferentes ao tipo de indutor. O campo foi capaz de promover a apoptose e mitose nas células e, não ocasionou necrose ou qualquer modificação da forma celular.

Fijalkowski et al. (2015) estudaram a influência do campo magnético rotatório em cultivo de *Glucanacetobacter xylinus*, avaliando a taxa de produção e a qualidade da celulose bacteriana sintetizada. Os resultados encontrados revelaram que a exposição da *G. xylinus* ao CME altera a biogênese da celulose e disponibiliza uma maneira de controlar o processo. Além disso, a exposição ao campo fez com que a celulose obtida apresentasse melhores propriedades, como absorção de água, em comparação à celulose obtida sem exposição.

Tu et al. (2015) propuseram o uso de CME para aumentar o crescimento de algas e a taxa de produção de oxigênio. Em seus estudos, utilizaram a microalga *Scenedesmus obliquus*, que foi cultivada em águas residuais. Os resultados mostraram que o campo aplicado (100 mT) na fase de crescimento logarítmico por 0,5 h foi capaz de estimular o crescimento da microalga, além de aumentar a produção de oxigênio em 24,6 % em relação ao controle (sem aplicação de CME).

2.3.1.6. Ultrassom

Técnicas para melhorar os processos fermentativos estão sendo estudadas e, umas das técnicas mais recentes é a implementação da sonicação, ou melhor, da irradiação por ultrassom (U). A exposição a baixas e moderadas frequências de U ocasiona uma melhora nos processos enzimáticos e microbianos. Isso se deve ao fato de que, quando há aplicação de U, há microturbulência intensa no meio e geração de espécies reativas que, em associação, melhoram a transferência de massa no sistema, induzindo a mudanças nas estruturas enzimáticas intracelulares. Dessa maneira, há aumento da cinética de crescimento e, conseqüentemente, aumento na obtenção de produtos (BATGHARE; SINGH; MOHOLKAR, 2018; OJHA et al., 2017). A eficiência do U é dependente de parâmetros de controle internos e externos. A forma como o U atua no microrganismo, ainda é complexa e pouco compreendida (OJHA et al., 2017).

O U pode ser utilizado para induzir e/ou melhorar a obtenção de produtos metabólicos dos microrganismos. Shaheen et al. (2013) utilizaram U de pulso de baixa intensidade para melhorar a atividade metabólica de microrganismos e, com isso aumentar a obtenção de produtos. Em seus estudos utilizaram o fungo *Trichoderma reesei* para obtenção de celulase e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* para obtenção de bioetanol. As melhores respostas foram obtidas com uso de 20% de intensidade de 80 mW cm^{-2} em exposição de 5 min e 12 exposições por dia. Batghare, Singh e Moholkar (2018) estudaram o aumento da produção de astaxantina por meio de indução utilizando U em cultivos de *Phaffia rhodozyma*. Os resultados obtidos mostraram que a aplicação de 33 kHz e 140 kPa no ciclo de trabalho nas 12 horas finais da fermentação aumentou a produção de astaxantina de $8,6 \text{ mg L}^{-1}$ para 1728 mg L^{-1} .

Por outro lado, o U também pode inativar o microrganismo, dependendo de como, por quanto tempo e com qual intensidade é aplicado. Gao et al. (2014) propuseram um modelo teórico para explicar as forças de cisalhamento geradas pela cavitação, processo oriundo do U. No modelo proposto, considerou-se o número de bolhas da cavitação e a capacidade da parede celular microbiana de resistir às forças de cisalhamento. Em seus estudos foram utilizados U de alta potência e baixa frequência e, os microrganismos estudados foram uma bactéria, *Enterobacter aerogenes* e uma levedura, *Aureobasidium pullulans*. Para ambos os microrganismos, o logaritmo da taxa de inativação diminui linearmente com o tempo de exposição ao U, e a taxa de inativação aumentou com o aumento da potência do U.

2.4. MODELAGEM MATEMÁTICA EM BIOPROCESSOS

A complexidade envolta nos bioprocessos, faz com que sua representação matemática seja limitada e baseada apenas na idealidade, uma vez que, há limitações matemáticas para representar simultaneamente os processos físico-químicos, biológicos e genéticos implicados no processo (BAILEY, 1998; BONOMI; SCHMIDELL, 2001; FREDRICKSON; MEGEE III; SIKYTA, 1995; TORRES; SANTOS, 2015; TSUCHIY, 1970;). Isso ocorre porque a complexidade do modelo matemático é ampliada com o aumento das variáveis de processo, tais como condições ambientais, consumo de múltiplos substratos e formação de produto, variação de pH e temperatura, mudanças reológicas do meio de cultivo, aeração, agitação, entre outras (GONZÁLEZ-FIGUEIREDO; FLORES-ESTRELLA, ROJAS-REJÓN, 2019).

A modelagem matemática de processos fermentativos pode ser definida como uma tentativa de representar, por meio de modelos matemáticos, os balanços de massa associados aos processos que ocorrem no biorreator, de modo a representar fidedignamente algumas propriedades do processo. A capacidade de predição do modelo é determinada pela correlação entre os dados experimentais e o modelo, ou seja, se os dados previstos pelo modelo estiverem de acordo com os dados experimentais, significa que o modelo descreve os fenômenos que controlam o desempenho do processo (BAILEY, 1998; BONOMI; SCHMIDELL, 2001; KOUTINAS et al., 2012; MATA-ALVAREZ ET AL., 2009; SIKYTA, 1995; TORRES; SANTOS, 2015).

Os modelos matemáticos, juntamente com os mapas metabólicos, gerados a partir de análises computacionais, auxiliam no entendimento das conexões metabólicas conhecidas e tentam prever comportamentos com base nesses modelos (DOWNS, 2006). As vantagens de se realizar tal metodologia são o auxílio no controle do processo, a redução de custos e a melhoria da qualidade do produto (SILVEIRA; MAZUTTI; SALAU, 2016).

O objetivo fundamental da modelagem de processos fermentativos é prever a dinâmica do processo. Além disso, os modelos permitem organizar as informações a respeito do processo em conjunto e de forma coerente, determinar os componentes e suas interações em um sistema complexo, otimizar o processo, além de explicar o comportamento dos microrganismos em determinadas condições de cultivo (BAILEY, 1998; BONOMI; SCHMIDELL, 2001; FREDRICKSON; MEGEE III; TSUCHIY, 1970; SIKYTA, 1995; TORRES; SANTOS, 2015). A modelagem matemática, desse tipo de processo, tem o intuito de analisar de forma abrangente os principais fenômenos que caracterizam as interações dos microrganismos com o ambiente e o tipo de processo fermentativo (BONOMI; SCHMIDELL, 2001; TORRES; SANTOS, 2015).

Para a elaboração de um modelo matemático é necessário estabelecer as variáveis que caracterizam o estado do sistema em cada instante. Desse modo, com as variáveis de processo definidas, o próximo passo é definir as variáveis independentes que irão afetar o desempenho das respostas e como elas o afetam (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

Quando as variáveis estão definidas, parte-se para a elaboração das equações matemáticas que irão reger os modelos.

Modelos matemáticos podem ser utilizados para reproduzir e prever dados experimentais. Phisalaphong, Srirattana e Tanthapanichakoon (2006) desenvolveram um modelo matemático para descrever os efeitos da temperatura em cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*. O modelo proposto pelos autores demonstrou que elevadas temperaturas reduzem o rendimento do processo e afetam significativamente os parâmetros do processo. Silveira, Mazutti e Salau (2014) construíram um modelo matemático para prever o perfil de crescimento da *Kluyveromyces marxianus* e de temperatura em um reator de leito fixo para FES utilizando cana de açúcar como substrato. Para isso, realizaram estimação dos parâmetros do modelo para ajustá-lo aos dados experimentais. Os resultados obtidos pelos autores indicaram que os parâmetros estimados foram significativos e que o modelo foi adequado para reproduzir os dados experimentais.

Há também a possibilidade da utilização desses modelos para prever e descrever a interação entre microrganismos, como competição, mutualismo, predação, entre outras. Sivaprakash e Karunanithi (2009) estudaram a interação entre *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae* em relação à interação de amensalismo. Os modelos estudados demonstram que o crescimento de ambas as espécies segue o padrão do modelo logístico e o mesmo se dá para culturas mistas de *Schizosaccharomyces*. O modelo logístico modificado que incorpora o efeito de interação desta espécie com *Saccharomyces cerevisiae* também é capaz de descrever e prever o crescimento. Sivaprakash, Karunanithi e Jayalakshmi (2011) estudaram e simularam a interação entre duplas de microrganismos, a fim de caracterizar os padrões de interações. Dessa forma, os estudos demonstram que o crescimento de culturas mistas não depende apenas das condições ambientais e nutricionais para cada espécie envolvida, mas também da interação entre elas.

2.4.1. Classificação de modelos matemáticos de processos fermentativos

Os modelos matemáticos comumente utilizados para processos fermentativos podem ser separados em dois grandes grupos: modelos fenomenológicos e os modelos empíricos (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

2.4.1.1. Modelos Fenomenológicos

Os modelos chamados de fenomenológicos baseiam-se em hipóteses e correlações teóricas. Estes modelos são empregados para explicar os fenômenos e os comportamentos das variáveis envolvidas no processo. Constituem-se de um conjunto de relações matemáticas entre as variáveis alvo do estudo realizado.

Esses modelos devem ser fundamentais e baseados em termodinâmica, conservação de massa e energia e quantidade de movimento, e em princípios físico-químicos, apresentando as equações que os descrevem, bem como as equações que envolvem a cinética do metabolismo microbiano (BONOMI; SCHMIDELL, 2001; PINTO; LAGE, 2001).

Para propor um modelo matemático para um processo fermentativo, deve-se fazer algumas considerações para simplificar o equacionamento. Para tal, considera-se que apenas um número específico de constituintes do meio de cultivo irá agir como inibidor para o crescimento do microrganismo e considerar que alguns fatores não afetam de forma significativa o processo, de forma que seus efeitos podem ser desprezados (BONOMI; SCHMIDELL, 2001).

2.4.1.2. Modelos Empíricos

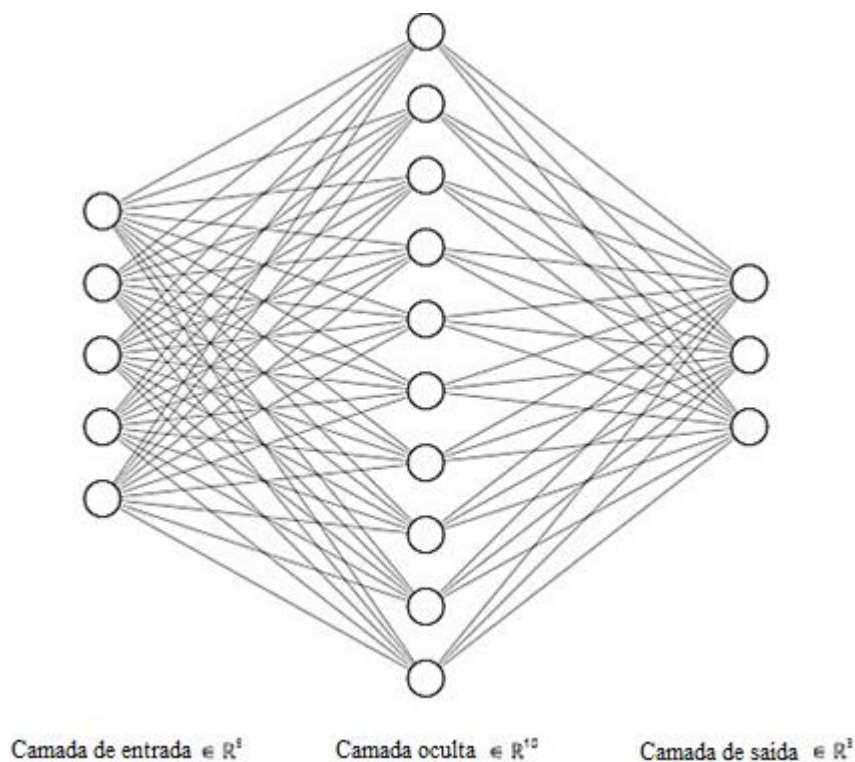
O crescimento cinético do microrganismo tem sua estrutura baseada em informações oriundas de observações empíricas, ou seja, observações advindas de dados experimentais (GONZÁLEZ-FIGUEIREDO; FLORES-ESTRELLA, ROJAS-REJÓN, 2019). Dessa maneira, os modelos empíricos são modelos que, partindo de um número definido de variáveis de entrada medidas, permitem calcular uma ou mais respostas do sistema (suas saídas). O principal e mais popular modelo empregado atualmente são as redes neurais artificiais (BONOMI; SCHMIDELL, 2001; LEE; CHUNG; HWANG, 2016).

Redes neurais artificiais (ANN, do inglês *Artificial Neural Network*) são modelos matemáticos baseados nos processos neurais biológicos. Podem ser definidas como modelos

computacionais que visam compreender as formalizações matemáticas de estrutura e funções do cérebro, que são constantemente reformuladas através da experiência e extraindo conhecimento dessa mesma experiência. Reproduzindo a interação entre os neurônios cerebrais, as ANNs são processos simples e robustos para transmitir e processar informações. Dessa maneira, conta com elementos simples, denominados de neurônios, que, de acordo com a complexidade da conexão entre si, podem descrever o comportamento não – linear de sistemas dinâmicos (GONZÁLEZ-FIGUEIREDO; FLORES-ESTRELLA, ROJAS-REJÓN, 2019).

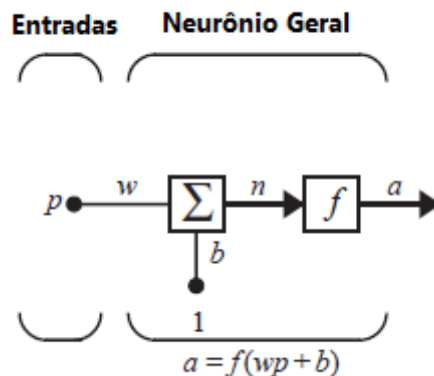
A estrutura de uma ANN é desenvolvida a partir dos dados experimentais. Sua estrutura é composta por camadas, a camada de entrada que contém as variáveis de entrada do processo, uma camada (ou mais camadas) oculta de neurônios e, uma camada de saída que contém as respostas do processo, (GONZÁLEZ-FIGUEIREDO; FLORES-ESTRELLA, ROJAS-REJÓN, 2019; PADILHA, 2013) conforme Figura 5. A construção das redes é realizada por dispositivos computacionais simples, intensamente interconectados e, as conexões presentes entre os neurônios irão determinar a função da rede (HAGAN et al., 2014).

Figura 5 - Exemplo de uma rede neuronal artificial com 5 entradas, 10 neurônios na camada oculta e 3 saídas.



Dessa maneira, o algoritmo de treinamento da rede utiliza um sistema pré-estabelecido de pesos e compensações para cada neurônio, de modo que as variáveis de entrada possam convergir para as variáveis de saída (GONZÁLEZ-FIGUEIREDO; FLORES-ESTRELLA, ROJAS-REJÓN, 2019). Isto quer dizer que, uma determinada entrada, cujo valor é um número escalar, é multiplicada por um peso, também um número escalar, e essa multiplicação passa por um somatório enquanto, outra entrada também presente no sistema será multiplicada por uma compensação e também será adicionada ao somatório, conforme Figura 6. Após passarem pelo somatório, fornecerão uma saída do somatório que será transmitida para uma função de transferência para produzir um valor final de saída da rede. A função de transferência pode ser linear ou não linear e é escolhida de acordo com a especificação do problema em estudo. De modo geral, a função de transferência é ajustada de modo a relacionar a entrada e saída do sistema (HAGAN et al., 2014).

Figura 6 - Exemplificação da estrutura de um neurônio de entrada única.



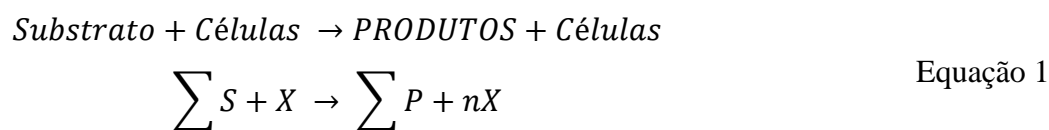
Fonte: (HAGAN et al., 2014, adaptada)

O uso de ANNs em bioprocessos é uma área pouco explorada, embora apresente vantagens. Dutta, Dutta e Banerjee (2004) utilizaram a metodologia de superfície de resposta e ANN para otimizar a produção de proteases extracelulares a partir de *Pseudomonas* sp. avaliando os efeitos de pH, temperatura e volume de inóculo. Os resultados demonstraram que a ANN apresenta maior capacidade de predição do modelo em comparação à metodologia de superfície de resposta. Rio-Chanona et al. (2016) utilizaram ANN para prever a produção de C-ficocianina através de cianobactéria em processo batelada alimentada de 15 dias. Os autores utilizaram duas estratégias de ANN: na primeira, adicionaram um conjunto de dados artificiais

adicionando ruídos aleatórios ao conjunto de dados experimentais, enquanto na segunda, avaliou-se a mudança de variáveis de estado como saída de dados de treinamento. Os resultados mostraram que, ambas as estratégias fornecem boa modelagem e previsão para estimar o desempenho do processo em batelada alimentada e, ao otimizarem as condições de operação para 12 h de processo, houve aumento significativo na produção de C-ficocianina, o que demonstrou a alta eficiência da ANN na otimização do processo.

2.5. MODELOS CINÉTICOS PARA CRESCIMENTO DE MICRORGANISMOS

Os microrganismos podem crescer sob uma vasta condição física, química e nutricional, sendo o crescimento microbiano, portanto, a resposta ao ambiente físico-químico. Desse modo, em um ambiente nutricionalmente adequado, os organismos extraem os nutrientes do meio e os convertem em metabólitos (primários ou secundários). Como resultado, há aumento de biomassa e formação de produto, conforme Equação 1 (SHULER; KARGI, 2002).



O crescimento microbiano deve ser entendido dinamicamente em termos de descrições cinéticas. Vale ressaltar que as respostas da composição celular e a capacidade biossintética mudam de acordo com as condições experimentais (SHULER; KARGI, 2002).

A descrição matemática do crescimento microbiano é complexa e não inclui completamente os aspectos biológicos (SIKYTA, 1995). Na literatura são descritos diversos modelos matemáticos que descrevem o crescimento microbiano, desde o mais simples até os mais sofisticados.

2.5.1. Modelos gerais para taxa de crescimento

Na literatura existem modelos matemáticos para descrição de crescimento microbiano de uma forma geral. Estes modelos levam em consideração o consumo de substrato e a taxa máxima de crescimento do microrganismo, o que os tornam capazes de serem aplicados para diversos cultivos microbianos.

2.5.1.1. Verhulst (1838)

A equação de Verhulst (1838) propõe um modelo no qual a dinâmica de crescimento de um determinado ambiente tem seus recursos limitados. Esta equação baseia-se no princípio de que a taxa de crescimento de uma determinada população é proporcional à população e à quantidade de recursos disponíveis, conforme Equação 2.

$$\mu_x = \mu_{max} \times \left(1 - \frac{X}{X_{max}}\right) \quad \text{Equação 2}$$

Nesse modelo, μ_{max} é a taxa de crescimento máxima, X_{max} é o crescimento máximo da população e X é o crescimento populacional.

2.5.1.2. Monod (1942)

Monod (1949) propôs uma equação hiperbólica para relacionar a taxa de crescimento com a concentração de um dos nutrientes essenciais ao processo. Seu modelo assemelha-se, conforme mostra a Equação 3, a uma isoterma de adsorção ou à conhecida equação de Michaelis-Menten.

$$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} \times \left(\frac{S}{K_s + S}\right) \quad \text{Equação 3}$$

Seu modelo é simples e conta com a constante de saturação (K_s), relacionada ao substrato, com a taxa de crescimento máximo ($\mu_{m\acute{a}x}$) e com a concentração (S) de um dos componentes do meio de cultivo (MONOD, 1949; HISS, 2001).

2.5.1.3. Contois (1959)

O modelo proposto por Contois (1959), Equação 4, leva em consideração o efeito da densidade de microrganismos sobre a taxa específica de crescimento. Para ele, a densidade populacional (número de microrganismos presentes no meio) interfere na velocidade com que estes crescem.

$$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} \times \left(\frac{S}{(K_s \times X) + S} \right) \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o 4}$$

Nesse modelo, $\mu_{m\acute{a}x}$ e K_s s\~{a}o par\~{a}metros de crescimento que tornam-se constantes em condi\c{c}\~{o}es definidas e representam a taxa de crescimento m\~{a}xima e a constante do modelo de Monod, respectivamente. A vari\~{a}vel μ_x permanece sendo a taxa de crescimento do microrganismo e S a concentra\c{c}\~{a}o de substrato.

2.5.1.4. Andrews (1968)

O modelo matem\~{a}tico para descrever o crescimento microbiano proposto por Andrews (1968) \~{e} caracterizado por incluir o efeito da inibi\c{c}\~{a}o de substrato. Em seu modelo, Andrews relaciona a concentra\c{c}\~{a}o do substrato e a taxa espec\~{i}fica de crescimento, conforme Equa\c{c}\~{a}o 5. Simula\c{c}\~{o}es de fermenta\c{c}\~{o}es mostraram que a inibi\c{c}\~{a}o por substrato ocorre de formas diferentes em culturas em batelada e cont\~{i}nuas, na primeira h\~{a} o aumento do tempo de lat\~{e}ncia e, na outra, pode ocorrer instabilidade do processo.

$$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} \times \left(\frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_I}} \right) \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o 5}$$

Entretanto, para simplificar o processo, seu modelo desconsidera a ocorr\~{e}ncia de morte celular e da utiliza\c{c}\~{a}o de substrato para a manuten\c{c}\~{a}o do microrganismo. Al\~{e}m disso, assume que n\~{a}o h\~{a} inibi\c{c}\~{a}o por produto e nem atraso nas respostas do microrganismo \~{a}s mudan\c{c}\~{a}os de concentra\c{c}\~{a}o do substrato.

Nesse modelo, $\mu_{m\acute{a}x}$ \~{e} a taxa de crescimento m\~{a}xima, K_s \~{e} a constante de satura\c{c}\~{a}o de Monod, S \~{e} a concentra\c{c}\~{a}o de substrato e K_I \~{e} a constante de inibi\c{c}\~{a}o.

2.5.1.5. Hiss (2001)

Com o intuito de explicar a redu\c{c}\~{a}o que ocorre na velocidade de crescimento, uma altera\c{c}\~{a}o foi realizada na equa\c{c}\~{a}o de Monod. Nesse modelo, Equa\c{c}\~{a}o 6, leva-se em considera\c{c}\~{a}o a inibi\c{c}\~{a}o pelo substrato.

$$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} \times \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \times \left(\frac{K_I}{K_I + S} \right) \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o 6}$$

Em que, $\mu_{m\acute{a}x}$ é a taxa de crescimento m\acute{a}xima, K_s é a constante de satura\c{c}\~{a}o de Monod, S é a concentra\c{c}\~{a}o de substrato e K_I é a constante de inibi\c{c}\~{a}o.

2.5.2. Modelos para microrganismos fotossintetizantes

Alguns microrganismos, entretanto, possuem algumas especifica\c{c}\~{o}es em suas condi\c{c}\~{o}es de cultivo, como é o caso dos fototr\~{o}ficos. Nesse caso, para que o modelo seja coerente aos dados experimentais e que as fontes de energia dos microrganismos sejam levadas em considera\c{c}\~{a}o, é necess\~{a}rio que o modelo apresente a influ\~{e}ncia da ilumin\~{a}ncia (ou incid\~{e}ncia de luz).

2.5.2.1. Tamiya (1953)

Tamiya et al. (1953) propuseram um modelo matem\~{a}tico para descrever o crescimento de microalgas. Em seu modelo, a taxa de crescimento (μ) é dada pela Equa\c{c}\~{a}o 7.

$$\mu_x = \frac{(\alpha \times \mu_G \times I)}{\mu_G + (\alpha \times I)} \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o 7}$$

Na qual, há a influ\~{e}ncia da intensidade da luz (I), da taxa de crescimento saturada de luz (μ_G) que est\~{a} relacionada com a taxa fotossint\~{e}tica e a taxa constante de crescimento no escuro (k_d) (Equa\c{c}\~{a}o 8), e de uma constante (α_1) (Equa\c{c}\~{a}o 9) que corresponde ao valor da derivada da taxa fotossint\~{e}tica (k_p) em rela\c{c}\~{a}o a intensidade luminosa (I).

$$\mu_G = \frac{k_p \times k_d}{k_p + k_d} \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o 8}$$

$$\alpha_1 = \frac{dk_p}{dI} \quad \text{Equa\c{c}\~{a}o 9}$$

2.5.2.2. Bannister (1979)

Bannister (1979) descreveu um modelo matemático empírico, no qual assume que o crescimento é limitado pela incidência de luz e que pode ser descrito em função da irradiância absorvida pelo microrganismo (I_0), como demonstra a Equação 10.

$$\mu_x = \frac{(\mu_{max} + R'_p) \times I}{(I_g^n + I^n)^{1/n} - R'_p} \quad \text{Equação 10}$$

Em que, μ_{max} é a taxa de crescimento saturada de luz, cujo valor depende da espécie e da temperatura de crescimento, R'_p é o valor limite da irradiância quântica instantânea incidente na suspensão celular (I) quando esta é zero ($I = 0$), da constante de velocidade de primeira ordem (R_p), da respiração das microalgas. I_g é o parâmetro de saturação da luz de crescimento e n é o “parâmetro de forma”, que descreve a brusquidez da transição para o crescimento saturado de luz.

2.5.2.3. Aiba (1982)

A Equação 11, desenvolvida por Aiba (1982), leva em consideração os efeitos da intensidade luminosa no crescimento de microalgas afirmando que a intensidade luminosa, quando em excesso, pode acarretar em inibição, assim como há inibição por elevadas concentrações de substrato. Tal modelo leva em consideração uma constante de saturação e uma constante de inibição luminosa.

$$\mu_x = \mu_{max} \times \left(\frac{I}{K_S + I + \frac{I^2}{K_L}} \right) \quad \text{Equação 11}$$

Os termos da equação representam: μ_{max} a taxa máxima de crescimento, I a intensidade luminosa, K_S constante de saturação em relação à luz e K_L constante de inibição luminosa.

2.5.2.4. Grima (1993)

Segundo Grima et al. (1993), em se tratando de microrganismos fotossintetizantes, a relação da capitação de energia luminosa apresenta uma relação de dependência hiperbólica da intensidade da luz. Entretanto, seguindo o modelo de Moser, foi adicionado um expoente n , para o ajuste da cinética de crescimento com o efeito sigmoidal que ocorre em baixas intensidades luminosas, conforme Equação 12. O parâmetro n leva em consideração a brusquidez da curva μ versus I_{av} , sendo análogo ao parâmetro de forma de Bannister (GRIMA et al., 1993; GRIMA et al., 1996).

$$\mu_x = \frac{\mu_{max} \times I^n}{I^n + I_k^n} \quad \text{Equação 12}$$

No qual, μ_{max} é taxa máxima de crescimento do microrganismo e I_k é análogo ao K_s , representando a afinidade das células à luz (GRIMA et al., 1993).

2.5.2.5. Grima (1996)

Grima et al. (1996) descreveram um modelo que inclui fotolimitação e fotoinibição de forma simultânea. O modelo proposto, Equação 13, considera a taxa de crescimento específica como sendo uma relação entre a irradiância média e a adaptabilidade celular à luz quando a irradiação a qual os microrganismos estão expostos é máxima.

$$\mu_x = \frac{\mu_{max} \times I_{av}^{\frac{n_2}{I_0}}}{I_{av}^{\frac{n_2}{I_0}} + \left[I_k + \left(\frac{I_0}{K_m} \right)^{n_1} \right]^{\frac{n_2}{I_0}}} \quad \text{Equação 13}$$

Tal modelo possui parâmetros que levam em consideração as características dos microrganismos (μ_{max}), a variação da taxa de crescimento (μ), a irradiância média dentro do cultivo (I_{av}) e o efeito da fotoinibição como função da irradiância incidente (K_m para modelar a extensão e um parâmetro de forma, n_2).

2.5.2.6. Pérez (2008)

Pérez et al. (2008) descreveram um modelo para expressar a influência do pH no crescimento de microalgas, Equação 14.

$$\mu_x = \left(\frac{\mu_{max}}{1 + \frac{[H^+]}{K_1} + \frac{K_2}{[H^+]}} \right) \quad \text{Equação 14}$$

No qual, μ é a taxa de crescimento específico, μ_{max} é a taxa de crescimento máxima, $[H^+]$ corresponde a concentração de prótons no meio e K_1 e K_2 são constantes cinéticas correspondentes.

2.5.2.7. Sánchez (2008)

Baseados nos modelos de Grima et al. (1993) e Roels (1983), Sánchez et al. (2008) obtiveram um modelo global, Equação 15, para o crescimento de microalgas, no qual há a consideração da influência da irradiância e da temperatura.

$$\mu_x = \frac{\left[\left(A_1 \times \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right) \right) - \left(A_2 \times \exp\left(\frac{E_b}{RT}\right) \right) \right] \times I_{av}^n}{I_{av}^n + \left(\frac{I_{k,max} \times I_0'}{I_k' + I_0'} \right)^n} \quad \text{Equação 15}$$

Em que, as variáveis A_1 e A_2 são constantes relacionadas com a formação de compostos ativados que impulsionam o processo, tanto de maneira favorável quanto desfavorável. A variável A_1 é positiva, enquanto A_2 é negativa. As variáveis E_a e E_b relacionam-se com as energias de ativação correspondentes para cada parte da correlação. A variável I_k é irradiância constante e I_0' é a irradiância externa.

2.5.3. Modelo para cinética de consumo de substrato

A maneira como o microrganismo consome o substrato é passível de ser descrita por meio de modelos matemáticos. Tal equacionamento pode auxiliar o entendimento da interação microrganismo/substrato. Comumente, é utilizado o componente majoritário do meio de

cultivo, uma vez que é difícil equacionar todas as interações de todos os componentes do substrato e o microrganismo.

2.5.3.1. Pirt (1965)

Pirt (1965) propôs que tanto a variação da taxa de crescimento quanto o rendimento do microrganismo em relação ao substrato são atribuídos ao consumo de energia a uma taxa constante de manutenção da célula. Dessa maneira, uma relação simples entre a manutenção, o rendimento e a taxa de crescimento é estabelecido, conforme Equação 16.

$$\mu_s = \left(\frac{\mu_x}{Y_{X/S}} \right) + m \quad \text{Equação 16}$$

Na qual, μ_x é a taxa de crescimento específica do microrganismo, $Y_{X/S}$ é o rendimento do crescimento microbiano em relação ao consumo do substrato e m é o coeficiente de manutenção.

2.5.4. Modelos cinéticos para obtenção de produto

Assim como o consumo de substrato, a formação de produtos por meio da fermentação é passível de ser descrita por meio de modelos matemáticos. Tal equacionamento está diretamente relacionado ao crescimento microbiano.

2.5.4.1. Luedeking e Piret (1959)

Segundo Luedeking e Piret (1959), a taxa de formação do produto está relacionada à taxa de crescimento do microrganismo e à densidade, conforme Equação 17, sendo influenciada pelo pH do meio de cultivo (LUEDEKING et al., 1959; HISS, 2001).

$$\mu_p = \alpha X + \beta \quad \text{Equação 17}$$

Nesse caso, X representa o crescimento do microrganismo, enquanto, α e β são constantes de proporcionalidade (LUEDEKING et al., 1959; HISS, 2001).

2.5.4.2. Ghose e Tyagi (1979)

Ghose e Tyagi (1979) propuseram um modelo cinético para o produto que associa o crescimento com a obtenção de produtos, de modo que o modelo contabilize a possível inibição pela geração do produto, conforme demonstra a Equação 18.

$$\mu_p = \mu_x \times \left(1 - \frac{P}{P_m}\right) \quad \text{Equação 18}$$

Em que, P é a concentração do produto e P_M corresponde à concentração do produto quando não há mais crescimento celular.

2.6. INTEGRAÇÃO NUMÉRICA

A integração numérica apresenta grande aplicabilidade na área de engenharia. Fisicamente, a integração pode ser entendida como a determinação da área sob a curva do gráfico, da variável independente em relação à variável dependente. Desempenha um papel importante para resolução de equações diferenciais (ED) (CHAPRA; CANALE, 2008).

ED são denominadas como sendo a relação entre uma função desconhecida e uma ou mais de suas derivadas. Quando há uma equação cuja derivada relativa inclui apenas uma variável independente trata-se, portanto, de equações diferenciais ordinárias (EDO) (DAVIS, 1984). As EDO's estão presentes em diversos problemas de engenharia, pois muitas leis físicas são descritas em termos de taxa de variação de uma propriedade em detrimento de seu valor propriamente dito (CHAPRA; CANALE, 2008). Para solucionar uma EDO há diversos métodos numéricos, como Euler, Runge – Kutta e Dormand – Price.

2.6.1. Método de Euler

O método de Euler pode ser explícito ou implícito. O explícito é descrito como um método de integração por partes, o qual consiste em dividir a integração $[x_0, x_N]$ em N subintervalos, conforme Equação 19, que resulta em uma variável h , vista como tamanho do intervalo (DAVIS, 1984).

$$h = \frac{x_N - x_0}{N} \quad \text{Equação 19}$$

Desse modo, pelo método explícito a integração calcula-se um novo valor de y , como Equação 20 (CHAPRA; CANALE, 2008; DAVIS, 1984).

$$\begin{aligned} y(x_{i+1}) &= y(x_i) + h \times f(x_i, y_i) \\ i &= 0, 1, 2, \dots, N - 1 \end{aligned} \quad \text{Equação 20}$$

Para o método implícito, avalia-se a equação para uma diferenciação para frente, conforme mostra a Equação 21. Comumente resolve-se o método de Euler implícito por meio do Método de Newton (DAVIS, 1984).

$$\begin{aligned} y(x_{i+1}) &= y(x_i) + h \times f(x_{i+1}, y_{i+1}) \\ i &= 0, 1, 2, \dots, N - 1 \end{aligned} \quad \text{Equação 21}$$

2.6.2. Método de Runge – Kutta

A metodologia de Runge-Kutta (RK) se apresenta sob diversos aspectos em níveis de ordem de integração, podendo ser de segunda, terceira, quarta ordem, ordem elevada ou implícita. Entretanto, os métodos mais comuns de RK são os de quarta ordem (CHAPRA; CANALE, 2008).

RK são algoritmos explícitos que envolvem a avaliação de uma função f em pontos entre x_i e x_{i+1} . A equação geral é dada pela Equação 22 e 23 (DAVIS, 1984).

$$y_{i+1} = x_i + \sum_{j=1}^v w_j \times K_j \quad \text{Equação 22}$$

$$\begin{aligned} K_j &= h \times f(x_i + c_j h; y_i + \sum_{l=1}^{j-1} a_{jl} \times K_l) \\ c_1 &= 0 \end{aligned} \quad \text{Equação 23}$$

O método RK tornou-se popular para a resolução de integrais, visto que se trata de um método robusto e fácil de ser implementado (KALOGIRATOU et al., 2014).

2.6.3. Método Dormand – Prince

O método de integração Dormand – Prince (DP) é um método RK que foi desenvolvido em 1980 (DORMAND; PRINCE, 1980). Um ano após o desenvolvimento do método, os mesmos autores o aprimoraram, permitindo que o método fosse aplicado para ordens superiores (DORMAND; PRINCE, 1981).

Nesta metodologia, assim como no RK, também se utiliza médias ponderadas. Entretanto, neste método há duas médias diferentes, sendo uma para cada ordem. Diferentemente do RK, o DP utiliza 7 parâmetros k (MEIJARD, 1997). O método é definido pelas Equações 24 – 26, na qual a Equação 24 refere-se à quarta ordem e a Equação 25 à quinta ordem (CALVO; MONTIJANO; RANDEZ, 1990).

$$y_{n+1} = y_n + h \times \sum_{j=1}^7 b_j \times f_j \quad \text{Equação 24}$$

$$y_{n+1} = y_n + h \times \sum_{j=1}^6 b_j \times f_j \quad \text{Equação 25}$$

$$f_j = f(t_n + c_j \times h; y_n + h \times \sum_{i=1}^{j-1} a_{ij} \times f_i) \quad \text{Equação 26}$$

$$i = 1, 2, \dots, 7$$

O DP é um método robusto e eficiente para a resolução de EDO's. Desse modo, isso o torna apto para ser empregado em *softwares* como o MatLab, o qual encontra-se como padrão na *ode45* (SHAMPINE; REICHELDT, 1997).

2.7. ESTIMAÇÃO DE PARÂMETROS

O processo fermentativo é expresso matematicamente por equações diferenciais. Para que o modelo seja ajustado aos dados experimentais, há a necessidade do cálculo de parâmetros

que minimizem a função objetivo, isto é, que torne mínima a diferença entre os dados previstos pelo modelo e os dados experimentais. Em processos fermentativos, qualquer modelo matemático proposto conterá parâmetros difíceis de serem determinados diretamente e, cujo valor é desconhecido e necessário para o ajuste e construção do modelo (BONOMI; SCHMIDELL, 2001; FREDRICKSON; MEGEE III; TSUCHIY, 1970).

A estimação de parâmetros é uma técnica recorrente para a concepção de modelos matemáticos (FREDRICKSON; MEGEE III; TSUCHIY, 1970; TORRES; SANTOS, 2015). Trata-se de um passo fundamental para a modelagem matemática e precisa ter precisão e confiabilidade (DEGASPERI; FEY; KHOLODENKO, 2017; FEV; FINDEISEN; BULLINGER, 2008; FEV; BULLINGER, 2010; REITERER et al., 2013).

Essa técnica nada mais é do que o cálculo de valores numéricos que irão caracterizar a representação matemática do processo e são determinados por meio de dados experimentais. Ou seja, os valores determinados dos parâmetros, são estimados de forma a ajustar o modelo aos dados experimentais (DEGASPERI; FEY; KHOLODENKO, 2017; FEV; FINDEISEN; BULLINGER, 2008; FEV; BULLINGER, 2010; FREDRICKSON; MEGEE III; REITERER et al., 2013; TORRES; SANTOS, 2015; TSUCHIY, 1970).

Para realização da estimação dos parâmetros, define-se o objetivo em termos de uma função f , que é parametrizada, de tal modo que a otimização da mesma seja resumida em encontrar os parâmetros de forma a minimizar ou maximizar a função f , que é mais conhecida como “função objetivo” (MARINI; WALCZAK, 2015).

Quando a função objetivo (F_{obj}) é minimizada, ou seja, quando a diferença entre os dados experimentais (X_e) e os simulados (X_s) e minimizada, conforme mostrado na Equação 27, o ponto ótimo do parâmetro é alcançado (MAIWALD; TIMMER, 2008; SILVEIRA; MAZUTTI; SALAU, 2016).

$$[\min f(X)] = \left[\|X_e^i - X_s^i\|^2 \right]_{i=0, \dots, NY-1}^{j=1, NE} = \sum_{j=1}^{NE} \sum_{i=0}^{NY-1} F_{obj} [X(j, i)] \quad \text{Equação 27}$$

A definição da F_{obj} é feita de forma implícita e só pode ser avaliada no ponto de adequação que corresponde a um conjunto particular de parâmetros oriundos da solução candidata (MARINI; WALCZAK, 2015). Há diversas metodologias para estimação de parâmetros e com algoritmos para fazê-lo.

2.7.1. Otimização por enxame de partículas (PSO)

A otimização por enxame de partículas (PSO, do inglês *Particle Swarm Optimization*) é um método iterativo e é um algoritmo aleatório que através de um espaço definido (limites superior e inferior) determina o intervalo em que o valor de parâmetro ideal deve estar contido (CLERC, 2006; KENNEDY; EBERHART, 1995; MARINI; WALCZAK, 2015; POLI; KENNEDY; BLACKWELL, 2007; SCHWAAB et al., 2008). Trata-se, portanto, de um método estocástico, ou seja, um método de determinação probabilístico (BONYADI; MICHALEWICZ, 2017; MARINI; WALCZAK, 2015).

O conjunto de soluções candidatas à resolução da otimização, no PSO, são definidas como partículas que podem transcorrer através do espaço de busca definindo caminhos que se dirigem à melhor resposta, por meio de iterações, que podem conter o mínimo local ou global (CLERC, 2006; MARINI; WALCZAK, 2015; POLI; KENNEDY; BLACKWELL, 2007; SCHWAAB et al., 2008).

A principal vantagem do PSO é que em uma determinada região de busca é possível obter pelo menos uma boa localização que é usada em iterações subsequentes e na avaliação da função objetivo. Em cada iteração, mais informações sobre a região são coletadas, reduzindo a aleatoriedade das partículas em direção ao mínimo da função objetivo. À medida que as iterações prosseguem e o caráter aleatório diminui, as partículas se concentram nas regiões mais promissoras em uma pesquisa local que melhorará a solução (CLERC, 2006; POLI; KENNEDY; BLACKWELL, 2007; SCHWAAB et al., 2008).

Esta técnica pode ser utilizada para estimação de parâmetros em diversos casos. Cockshott e Hartman (2001) utilizaram o PSO como uma metodologia para melhorar o meio para a produção de Echinocandín B por *Aspergillus nidulans*. Os autores otimizaram 15 componentes médios em um total de 135 fermentações e, concluíram que o PSO conseguiu fornecer um meio de fermentação superior ao de controle. Bay et al. (2015) utilizaram o PSO para estimação dos parâmetros para o modelo de digestão anaeróbica modificada para simular a degradação do substrato e a influência do pH na produção de ácidos graxos voláteis. Os parâmetros dos modelos estudados demonstraram que o PSO foi o melhor algoritmo para estimativa de parâmetros

2.7.2. Trust – Region – Reflexive

O algoritmo *Trust – Region – Reflexive* é um algoritmo iterativo usado para determinar a direção de pesquisa e está fortemente associado a aproximação do modelo como os dados experimentais. Nesse algoritmo, o modelo aproximado é confiável na vizinhança da iteração atual, tida como a região de confiança, que é ajustada em cada iteração (COLEMAN; LI, 1996; MORÉ; SORENSEN, 1983; YUAN, 1998; YUAN, 2000). O *Trust – Region* trata-se, portanto, de um algoritmo que aborda as regiões de confiança do modelo (YUAN, 2000).

Tal algoritmo pode ser utilizado em modelos não convexos, o que é uma vantagem em comparação aos algoritmos de pesquisa de linha. Esse algoritmo é confiável e robusto e pode ser aplicado a problemas mal condicionados, além de apresentar boa convergência (Yuan, 2000; Yuan, 2015). Em comparação com algoritmos de pesquisa de linha, este método é mais fácil de obter a convergência global (YUAN, 2015).

Nesta metodologia, o cálculo é feito sobre um subproblema da região de confiança, resolvendo o problema de modo que a função do modelo seja minimizada em tal região (YUAN, 2015) e sendo passível de ser utilizada em diversos problemas.

2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A simulação computacional necessita de ser avaliada para assegurar a acurácia da capacidade de predição do modelo aos dados experimentais (Schwaab, 2007). Desse modo, os modelos podem ser avaliados com base no ajuste dos dados experimentais e de acordo com a precisão dos modelos.

O coeficiente de determinação (R^2) avalia a capacidade do modelo prever os dados experimentais. Este coeficiente indica a proporção da alteração na variável dependente (y) prevista pela regressão e a variável independente (x), o que representa o nível de variabilidade explicada no conjunto de dados, além de avaliar quão bem um modelo explica e prevê resultados futuros, conforme Equação 28. O valor para R^2 está localizado no intervalo de 0 a 1, e quanto mais próximo de 1, melhor o ajuste do modelo e menor a variação de y em relação a x (ASUERO; SAYAGO; GONZÁLEZ, 2006; ENDERS, 2017; KVALSETH, 1985). A soma do quadrado dos erros (SSE , do inglês, *Sum of Square Error*), Equação 29, representa a soma dos quadrados do desvio ou do erro para cada ponto de dados e, quanto menor for o seu valor, melhor o modelo.

O critério de informação de Akaike (AIC, do inglês *Akaike Criterion Information*), define a complexidade do modelo de acordo com o número de grau de liberdade (*DF*, do inglês *Degree Freedom*), conforme Equação 30. O modelo com menor valor de AIC é o melhor modelo (AKAIKE, 1974; BOZDOGAN, 2000). O erro quadrático médio (*MSE*, do inglês, *Mean Squared Error*), Equação 30, é uma ferramenta importante para determinar o desempenho de um modelo.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{NY} (X_{i,exp} - X_{i,mod})^2}{\sum_{i=1}^{NY} (X_{i,exp} - \bar{X}_{i,exp})^2} \quad \text{Equação 28}$$

$$SSE = \sum_{i=1}^{NY} (X_{i,exp} - X_{i,mod})^2 \quad \text{Equação 29}$$

$$AIC = NY \ln \left(\frac{SSE}{NY} \right) + 2NP + \frac{2NP(NP + 1)}{NY - NP - 1} \quad \text{Equação 30}$$

$$MSE = \frac{\sum_{i=1}^{NY} (X_{i,exp} - X_{i,mod})^2}{NE - NP} \quad \text{Equação 31}$$

Em que, $X_{i,exp}$ é o valor experimental da variável independente, $X_{i,mod}$ é o valor modelado, $\bar{X}_{i,exp}$ é a média dos valores observados, NP é o número de parâmetros e NY é o número de variáveis mensuradas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi dividido em estudos de caso, cada qual com um microrganismo diferente e processos fermentativos distintos, de acordo com os objetivos específicos propostos.

3.1. ESTUDO DE CASO 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO USO DE CAMPO MAGNÉTICO NO CRESCIMENTO DA MICROALGA *Spirulina sp.*

3.1.1. Microrganismo e Condições de Cultivo

O estudo de caso 1 foi realizado utilizando-se os dados experimentais obtidos da dissertação de mestrado de Mayara Copello Veiga (VEIGA, 2018).

Neste trabalho foi utilizada a microalga *Spirulina sp.* LEB 18, isolada da Lagoa Mangueira, localizada em Santa Vitória do Palmar – RS (MORAIS ET AL., 2008). O meio de cultura utilizado para cultivo do microrganismo foi o Zarrouk (ZARROUK, 1966).

As culturas foram realizadas em fotobiorreatores tubulares verticais com volume útil de 1,8 L. Um fotoperíodo de 12 h (claro/escuro) foi estabelecido ao longo de todos os experimentos. A iluminância utilizada foi $30 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e aeração de 0,3 vvm (volume de ar volume de meio⁻¹ min⁻¹), cultivado por 16 dias. A concentração inicial de biomassa foi $0,2 \text{ g L}^{-1}$. Os valores de taxa de crescimento máximo ($\mu_{m\acute{a}x}$) foram determinados pela regressão linear da fase de crescimento logarítmico no gráfico de $\ln X$ (g L^{-1}) versus tempo (dia). Nesta curva, a inclinação foi a taxa de crescimento específica máxima. Já o crescimento máximo ($X_{m\acute{a}x}$) foi determinado pela maior concentração de biomassa, que corresponde ao crescimento máximo do microrganismo.

A aplicação do campo magnético (CM) nos cultivos foi realizada em um período de 24 h d^{-1} , por meio da adaptação de ímãs de ferrite com intensidades de 30 mT ($150 \times 50 \times 10 \text{ mm}$) e 60 mT ($50 \times 50 \times 25 \text{ mm}$). Os ímãs foram dispostos a 180° um do outro e 150 mm acima da base do fotobiorreator (DAEMICI et al., 2016). Um cultivo controle foi realizado sem aplicação de CM e, além disso, utilizou-se material inerte para manter a mesma luminosidade dos demais cultivos recebiam. A temperatura (T) de cultivo para alguns dos experimentos foi mantida a 30°C ou 35°C e, a concentração de nitrogênio (N) inicial para alguns experimentos foi estabelecida em 2,50 ou $1,875 \text{ g L}^{-1}$. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os parâmetros cinéticos obtidos experimentalmente estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros cinéticos obtidos experimentalmente para o cultivo da *Spirulina* sp.

Experimento	μ_{max} (d ⁻¹)	X_{max} (g L ⁻¹)	CM (mT)	T (°C)	N (g L ⁻¹)
1	0,1867 ± 0,0379	1,02 ± 0,05	Sem aplicação de CM	30	2,50
2	0,1800 ± 0,0100	1,17 ± 0,07	30	30	2,50
3	0,1933 ± 0,0058	1,16 ± 0,06	60	30	2,50
4	0,2050 ± 0,0260	0,99 ± 0,03	Sem aplicação de CM	35	2,50
5	0,1733 ± 0,0611	1,02 ± 0,09	30	35	2,50
6	0,1633 ± 0,0115	1,14 ± 0,05	60	35	2,50
7	0,1767 ± 0,0292	1,03 ± 0,04	Sem aplicação de CM	30	1,875
8	0,1730 ± 0,0289	1,11 ± 0,07	30	30	1,875
9	0,2067 ± 0,0321	1,40 ± 0,06	60	30	1,875
10	0,1800 ± 0,0100	1,06 ± 0,06	Sem aplicação de CM	35	1,875
11	0,1767 ± 0,0115	1,04 ± 0,12	60	35	1,875
12	0,1367 ± 0,0231	1,01 ± 0,08	30	35	1,875

3.1.2. Modelo Matemático

3.1.2.1. Efeito simultâneo do campo magnético e iluminância

Para avaliação do efeito simultâneo CM e I, foram propostas 14 equações matemáticas diferentes baseadas em Verhulst (1838), que consideraram os efeitos da iluminância e do campo magnético no crescimento das microalgas, conforme Tabela 3, com a introdução de 2 novos parâmetros a serem estimados: K_i e K_M , afinidade do microrganismo a de iluminância e ao campo magnético, os quais estão representados nas equações por I e CM, respectivamente.

Tais parâmetros são semelhantes ao K_s da equação de Monod. Esses parâmetros foram estimados porque, assim como o K_s de Monod, eles são difíceis de serem determinados diretamente.

Para a estimação dos parâmetros propostos, foram utilizados os experimentos 1, 2 e 3 e para a validação os experimentos 4, 5 e 6, mostrados na Tabela 2.

Tabela 3 - Equações matemáticas propostas para serem utilizadas no modelo projetado para prever o crescimento de microalgas com aplicação de CM e I .

Modelos	
$\mu = \mu_{max} \times \left[\left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) + \frac{I}{K_i} + \frac{CM}{K_M} \right]$	Equação 32
$\mu = \mu_{max} \times \left[\left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) + \frac{I}{K_i + I} + \frac{CM}{K_M + CM} \right]$	Equação 33
$\mu = \mu_{max} \times \left[\left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \times \left(\frac{I}{K_i} + \frac{CM}{K_M} \right) \right]$	Equação 34
$\mu = \mu_{max} \times \left[\left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \times \left(\frac{I}{K_i + I} + \frac{CM}{K_M + CM} \right) \right]$	Equação 35
$\mu = \mu_{max} \times \left[\left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) + \frac{I}{K_i} \right]$	Equação 36
$\mu = \mu_{max} \times \left[\left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) + \frac{I}{K_i + I} \right]$	Equação 37
$\mu = \mu_{max} \times \left[\left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) + \frac{CM}{K_M} \right]$	Equação 38
$\mu = \mu_{max} \times \left[\left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) + \frac{CM}{K_M + CM} \right]$	Equação 39
$\mu = \mu_{max} \times \left[\left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \times \frac{I}{K_i} \right]$	Equação 40
$\mu = \mu_{max} \times \left[\left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \times \frac{I}{K_i + I} \right]$	Equação 41
$\mu = \mu_{max} \times \left[\left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \times \frac{CM}{K_M} \right]$	Equação 42
$\mu = \mu_{max} \times \left[\left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \times \frac{CM}{K_M + CM} \right]$	Equação 43
$\mu = \mu_{max} \times \left[\left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) + \left(\frac{I}{K_i} \times \frac{CM}{K_M} \right) \right]$	Equação 44
$\mu = \mu_{max} \times \left[\left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) + \left(\frac{I}{K_i + I} \times \frac{CM}{K_M + CM} \right) \right]$	Equação 45

3.1.2.2. Efeito da inibição pelo campo magnético

Para avaliação do efeito de inibição do CM , foram propostas 3 equações matemáticas diferentes, baseadas em Verhulst (1838) e nos modelos matemáticos presentes na Tabela 3, que

consideraram o efeito da inibição pelo CM apresentando um novo parâmetro: K_{MI} , denominado como a inibição por CM , como mostrado na Tabela 4. Para estimação dos parâmetros K_i e K_M foram utilizados os dados experimentais dos experimentos 7, 8 e 9 (Tabela 2). Para a estimação do valor de K_{MI} foram utilizados outros dados dos experimentos 10 e 11. A validação do modelo proposto para inibição foi realizada utilizando o experimento 12.

Tabela 4 - Equações matemáticas propostas para serem utilizadas no modelo projetado para prever a inibição pelo CM no crescimento de microalgas.

Modelos	
$\mu = \mu_{max} \times \left[\left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) + \left(\frac{I}{K_i} + \frac{CM}{K_M} \right) \right] \times \exp \left[-\frac{CM}{K_{MI}} \right]$	Equação 46
$\mu = \mu_{max} \times \left[\left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) + \left(\frac{I}{K_i + I} + \frac{CM}{K_M + MF} \right) \right] \times \exp \left[-\frac{CM}{K_{MI}} \right]$	Equação 47
$\mu = \mu_{max} \times \left(1 - \frac{X}{X_{max}} \right) \times \exp \left[-\frac{CM}{K_{MI}} \right]$	Equação 48

3.1.2.3. Estimação de parâmetros e análise estatística

A estimação dos parâmetros propostos foi realizada por meio de uma combinação híbrida de otimização de enxame de partículas (PSO) e algoritmos mínimos quadrados não-lineares (NLLS), utilizando as funções *particleswarm* e *lsqnonlin*, respectivamente, do software MatLab®.

Inicialmente, utilizou-se a PSO para a estimação inicial de parâmetros e em seguida, o algoritmo de mínimos quadrados não-lineares (NLLS) foi utilizado para refinar a busca pelos valores ótimos dos parâmetros. Desse modo, o NLLS utiliza os parâmetros obtidos pelo PSO como suposição inicial para estimar os parâmetros. A integração numérica foi realizada por meio da função *ode45*.

A avaliação estatística das equações propostas foi realizada de acordo com os seguintes critérios: R^2 , SSE e AIC , através das Equações 28, 29 e 30, respectivamente.

3.2. ESTUDO DE CASO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO USO DE CAMPO MAGNÉTICO NO CRESCIMENTO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

3.2.1. Microrganismo e condições de cultivo

Os dados experimentais referentes a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 foram obtidos da tese de doutorado de Lucielen Oliveira Santos (SANTOS, 2008).

O microrganismo foi cultivado em meio contendo: 54 g L⁻¹ de glicose, 50 g L⁻¹ de extrato de levedura e 12 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O. O volume útil do biorreator para o processo foi 3,5 L. As condições operacionais de temperatura, aeração, agitação, tempo de fermentação e concentração de inóculo foram 20 °C, 1,1 vvm, 500 rpm, 72 h e 5% (v/v), respectivamente.

Foram realizados 4 experimentos nas mesmas condições de temperatura, agitação, pH, aeração e nutrientes, variando-se apenas o tempo de exposição ao *CM* no ciclo celular: um experimento sem aplicação de campo magnético, e outros 3 variando o tempo de exposição ao *CM*: 24, 48 e 72 h. Os ímãs foram dispostos a uma distância de 5 mm do tubo de reciclo e a intensidade de *CM* aplicada foi 20 mT.

3.2.2. Modelo matemático

3.2.2.1. Redes neuronais artificiais (ANN)

Para o desenvolvimento da ANN as variáveis de entrada definidas foram: tempo (h), campo magnético (mT), agitação (rpm) e aeração (vvm). Concentração de biomassa (g L⁻¹), concentração de substrato, pH e glutatona (mg L⁻¹) foram definidas como variáveis de saída, conforme mostrado pela Figura 7. As configurações para a arquitetura da ANN são mostradas pela Tabela 5, a qual mostra que apenas se alterou o número de neurônios para as camadas ocultas, de modo que as variáveis de entrada e saída permaneceram inalteradas para todas as configurações. O número de neurônios e camadas ocultas foi testado em diferentes configurações, de modo a se obter o melhor ajuste e, de modo a não comprometer os graus de liberdade.

A rede foi implementada e simulada no *software* MatLab® comparando duas otimizações para cada configuração da rede: utilizando a função *trainlm*, baseada na otimização Levenberg-Marquardt (LM) e a função *trainbr*, baseada na otimização de regularização Bayesiana (BR). O algoritmo LM trata-se de uma variação do método de Newton e é planejado

para minimizar as funções que são somas de quadrados de funções não-lineares (HAGAN et al., 2014). O algoritmo BR incorpora o teorema de Bayes para a regularização (BURDEN; WINKLER, 2008).

Figura 7 - Arquitetura de uma das redes neurais artificiais utilizada, com 4 variáveis de entrada, uma camada oculta com 5 neurônios e 4 variáveis de saída.

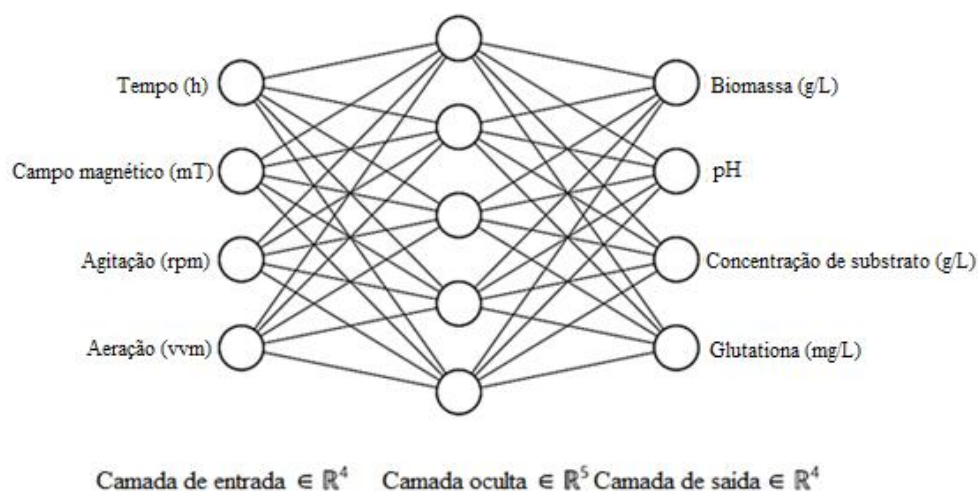


Tabela 5 - Configurações da estrutura utilizadas para a ANN.

Configuração	Número de camadas ocultas	Número de neurônios por camada
1	1	5
2	1	10
3	1	15
4	2	5 e 5
5	2	5 e 10
6	2	5 e 15
7	2	10 e 5
8	2	10 e 10
9	2	10 e 15
10	2	15 e 5
11	2	15 e 10
12	2	15 e 15

O desempenho da rede foi avaliado com base no ajuste aos dados experimentais e na capacidade de predição do modelo utilizado, segundo o R^2 , SSE e o erro quadrático médio MSE , através das Equações 28, 29 e 31, respectivamente. Sendo que o mais importante para o treinamento de redes neuronais artificiais é o MSE , visto que, é utilizado para avaliar o índice de desempenho da rede (HAGAN et al., 2014).

3.3. ESTUDO DE CASO 3 – MODELOS MATEMÁTICOS PARA CONSUMO DE SUBSTRATO

3.3.1. Microrganismo e condições de cultivo

Os dados experimentais referentes à levedura *Saccharomyces cerevisiae* foram cedidos por Lucielen Oliveira Santos e são pertencentes a sua tese de doutorado (SANTOS, 2008). *S. cerevisiae* foi cultivada em meio líquido contendo: glicose (54 g L^{-1}), extrato de levedura (50 g L^{-1}) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (12 g L^{-1}), cultivada no fermentador New-Brunswick-Bioflo III a 500 rpm e mantido à 20° C . Os parâmetros cinéticos obtidos experimentalmente estão dispostos na Tabela 6. A taxa de crescimento máximo ($\mu_{m\acute{a}x,x}$) foi determinado pela regressão linear da fase de crescimento logarítmico no gráfico de $\ln X$ (g L^{-1}) versus tempo (dia) e, a taxa de consumo de substrato pela regressão linear da fase de consumo de substrato logarítmico no gráfico de $\ln S$ (g L^{-1}) versus tempo (dia). Nestas curvas, a inclinação foi a taxa de crescimento específica máxima e a taxa de consumo específica máxima, respectivamente.

Tabela 6 - Parâmetros cinéticos para a *S. cerevisiae*.

Experimento	Parâmetros cinéticos	
	$\mu_{m\acute{a}x,x} \text{ (d}^{-1}\text{)}$	$\mu_{m\acute{a}x,s} \text{ (d}^{-1}\text{)}$
1	0,1723	-0,2225
2	0,1765	-0,2214

O experimento 1 foi utilizado para a estimação de parâmetros e, o 2 para a validação do modelo.

3.3.2. Construção do modelo matemático para consumo de substrato

Teoria: Princípio geral para o crescimento dos microrganismos e consumo do substrato

O crescimento microbiano é definido pelas condições ambientais às quais estão submetidos. O crescimento de qualquer microrganismo é um processo contínuo de interação entre as características do organismo e o habitat no qual está inserido (BERRY; BROWN,

1987). Consequentemente, as condições de cultivo são afetadas por fatores físicos como temperatura, pH, intensidade de luz, aplicação de campos magnéticos, ultrassom, entre outros. Também, e se não o mais importante, as condições de cultivo são afetadas principalmente por fatores químicos, como a disponibilidade de nutrientes.

A demanda nutricional é responsável pela ocorrência de manutenção celular, pela formação de proteínas, ácido nucléico, fosfolipídios, enzimas e pela produção de energia na forma de ATP, entre outras funções (BRUSLIN, 2017). Assim, o crescimento do microrganismo está direta e intrinsecamente associado ao consumo de substrato. A relação entre crescimento e consumo é descrita pela Equação 1:

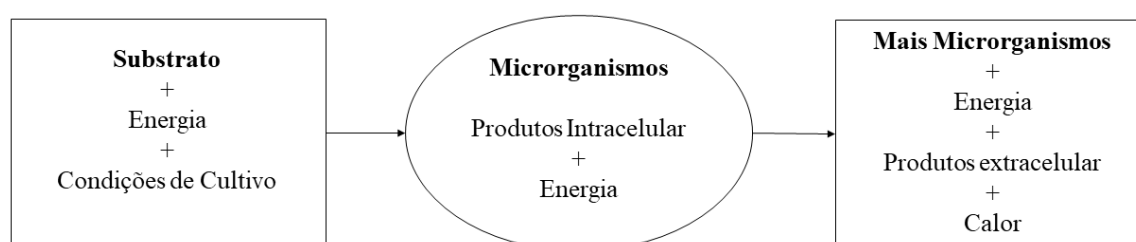
Substrato + Microrganismos → Produtos + Mais Microrganismos

$$\sum S + X \rightarrow \sum P + nX$$

Equação 1

De acordo com a Equação 1, o substrato é muito importante para o crescimento do microrganismo e, conseqüentemente, para a formação dos produtos, pois o consumo de substrato será convertido em aumento da biomassa microbiana e na formação do produto. A Figura 8 ilustra o esquema simplificado das etapas do processo.

Figura 8 - Esquema simplificado de entradas e saídas para o balanço de massa e energia do metabolismo microbiano.



O consumo de substrato pode ser dividido em dois termos de acordo com a finalidade: uma quantidade de substrato está gerando biomassa enquanto a quantidade restante está direcionada a produção de metabólitos secundários (SHULLER; KARGI, 2002). Portanto, a taxa de consumo de substrato pode ser descrita de acordo com a Equação 49, que relaciona esta variável de processo com o crescimento de microrganismos e a formação de produtos.

$$\frac{dS}{dt} = \frac{dS}{dX} + \frac{dS}{dP} \quad \text{Equação 49}$$

No entanto, como a formação do produto pode estar associada ao crescimento de microrganismos, a Equação 49 pode ser simplificada para a Equação 50, onde o termo dS/dP é considerada igual a zero.

$$\frac{dS}{dt} = \frac{dS}{dX} \quad \text{Equação 50}$$

A expressão dS/dt pode ser determinada de maneira análoga ao dX/dt , deixando-a em função de uma taxa específica, neste caso, denominada de taxa específica de consumo de substrato (μ_s). A μ_s pode ser obtida de forma semelhante à obtenção da taxa específica de crescimento (μ_x), que pertence a relação dX/dt . Comumente, a μ_x pode ser obtida de acordo com a equação de Monod (Monod, 1942):

$$\mu_x = \mu_{max,x} \times \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \quad \text{Equação 3}$$

em que a taxa de crescimento específica máxima ($\mu_{max,x}$) é obtida através da linearização da curva cinética de crescimento do microrganismo, como mostrado na Figura 9. O $\mu_{max,x}$ é a declividade da curva, representando seu coeficiente angular.

A taxa máxima de consumo específico do substrato ($\mu_{max,s}$) pode ser determinada de forma análoga ao $\mu_{max,x}$, ou seja, a regressão linear da fase logarítmica do consumo de substrato no gráfico de substrato versus tempo (Figura 10). O valor de $\mu_{max,s}$ pode ser negativo, pois representa a velocidade de consumo do substrato, que diminui com o tempo.

Assim, uma equação para descrever o consumo de substrato, formulada de forma análoga ao crescimento de microrganismos, é mostrada na Equação 51.

$$\mu_s = \mu_{max,s} \times \left(\frac{X}{K_x + X} \right) \quad \text{Equação 51}$$

Em que, μ_s representa a taxa específica de consumo de substrato, $\mu_{max,s}$ a taxa específica máxima de consumo de substrato, X é a concentração de biomassa e K_x é o parâmetro que relaciona o consumo de substrato com a habilidade do microrganismo de consumir o substrato.

Figura 9 - Curva cinética de crescimento de microrganismos (a) curva tradicional (b) curva linearizada.

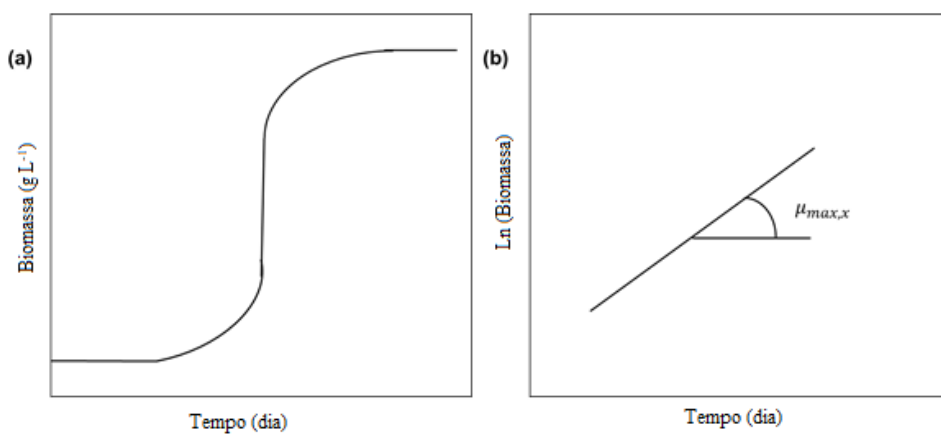
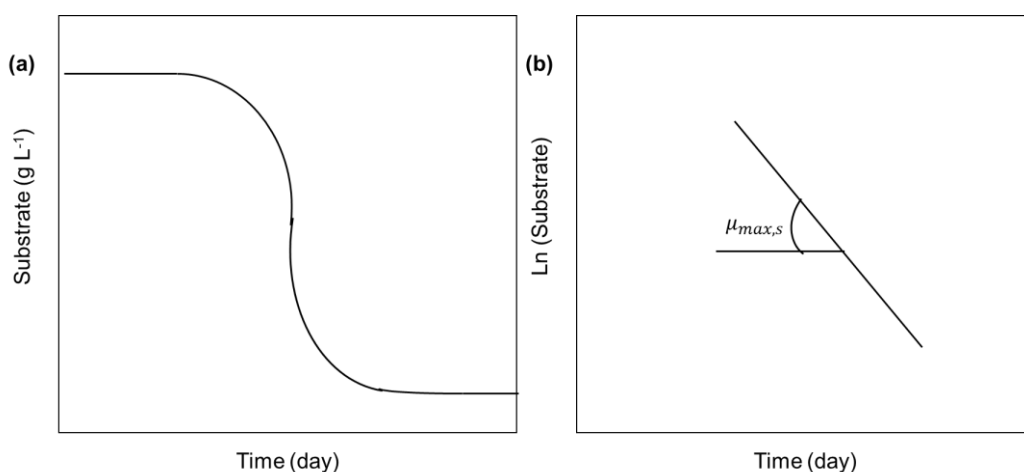


Figura 10 - Curva cinética de consumo de substrato (a) curva tradicional (b) curva linearizada.



A concentração de substrato é agora uma função de $\mu_{max,s}$, similarmente à concentração de biomassa. Entretanto, um novo parâmetro pode ser considerado, o coeficiente de manutenção

celular (m), que representa a quantidade de substrato necessária para a manutenção celular dos microrganismos. Assim, a expressão para o consumo de substrato é dada pela Equação 52.

$$\frac{dS}{dt} = (\mu_s \times S) + m \quad \text{Equação 52}$$

Em que, $\mu_{max,s}$ é negativo devido a inclinação da curva, representando seu coeficiente angular. A equação é integrada diretamente em relação ao substrato. Em alguns casos, o valor do m é tão pequeno quando comparado aos outros termos da Equação 52 que pode ser negligenciado.

Pode-se destacar que o modelo proposto para a equação de consumo de substrato (Equação 52) é indicado para a predição de concentração de substrato sob alta taxa de consumo inicial, ou seja, o modelo proposto é indicado para microrganismos cuja taxa de consumo inicial de substrato ocorre em questão de alguns minutos, causando um rápido decaimento inicial na curva cinética do substrato. O modelo proposto também é indicado para processos de fermentação nos quais ocorrem fortes interações entre o meio de cultura e o microrganismo, por exemplo, no processo de fermentação submersa.

3.3.2.1. Métodos computacionais para os modelos matemáticos para consumo de substrato

Primeiramente, o modelo proposto e a equação de Pirt (PIRT, 1965) foram utilizados para avaliar o consumo de substrato, conforme a Tabela 7. Além dos dois parâmetros K_x e K_s , pertencentes aos modelos em estudo e o parâmetro de manutenção celular (m), nas Equações 16 e 52, foram estimados para ajustar os dados experimentais.

Os parâmetros foram estimados usando a combinação híbrida de dois algoritmos: Otimização por Enxame de Partículas (PSO) (POLI; KENEDY; BLACKWELL, 2007; PEDERSEN, 2010; MEZURA-MONTES; COELLO, 2011) e os não-quadrados mínimos (NLLS), juntamente com o algoritmo de *Trust – Region – Reflective* (MORÉ; SORENSEN, 1983; YUAN, 1998), utilizando-se as funções *particleswarm* e *lsqnonlin*. Inicialmente, o PSO minimizou a função objetivo, Equação 53, para encontrar as melhores estimativas iniciais para os parâmetros, que foram refinados pela NLLS.

$$\min \begin{bmatrix} f(X) \\ f(S) \end{bmatrix} = \min \left[\begin{array}{c} \|X_{exp}^i - X_{mod}^i\|^2 \\ \|S_{exp}^i - S_{mod}^i\|^2 \end{array} \right]_{i=0, \dots, NY-1} = \sum_{i=0}^{NY-1} F_{obj} [X_i(i), S(i)]$$

Equação 53

A integração numérica das equações foi realizada utilizando a fórmula de Dormand-Prince (DORMAND; PRICE, 1980), por meio da função *ode45*. Os parâmetros foram estimados com intervalos de confiança (IC) de 95% (LANE; DUMOUCHEL, 1994). O erro quadrático médio (MSE) foi determinado pela Equação 48 para o cálculo do IC, pois este é um critério importante para medir o desempenho da técnica de estimação de parâmetros. A qualidade dos modelos ajustados pelos dados experimentais foi avaliada por meio de análise estatística, como o coeficiente de determinação (R^2) (Equação 28), soma dos erros quadráticos (SSE) (Equação 29), o critério de informação de Akaike (AIC) (Equação 30) e o erro quadrático médio (MSE) (Equação 31).

Todos os métodos computacionais foram realizados utilizando o software MatLab®.

Tabela 7 - Modelos matemáticos para prever o consumo de substratos e o crescimento do microrganismo.

	Equação	Referência
Consumo de substrato		
Modelo Proposto	$\frac{dS}{dt} = \left(\left(\mu_{max,s} \times \left(\frac{X}{K_x + X} \right) \right) \times S \right) + m$	Equação 52
Pirt	$\frac{dS}{dt} = - \left(\left(\left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} \right) + m \right) \times X \right)$	Equação 16 (Pirt, 1965)
Crescimento de microrganismo		
Monod	$\frac{dX}{dt} = \left(\left(\mu_{max,x} \times \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \right) \times X \right)$	Equação 3 (Monod, 1942)

3.4. ESTUDO DE CASO 4 – MODELOS MATEMÁTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA OBTENÇÃO DE PRODUTOS METABÓLICOS

3.4.1. Obtenção da levedura *Phaffia rhodozyma* e ativação do microrganismo

A levedura *Phaffia rhodozyma* NRRL - Y17268 foi concedida pelo banco de cepas da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Laboratório de Bioprocessos.

A levedura, inicialmente em tubos inclinados com ágar, foram reativados em caldo YM (*Yeast Malt*) líquido, conforme descrição da Tabela 8. O meio de cultivo foi esterilizado a 121°C por 15 min. Para reativação do microrganismo, este foi transferido para tubos contendo meio YM, incubados por 48 horas a 25 °C e mantidos sob agitação em *shaker* a 140 rpm. Subsequentemente, foram transferidos para *erlenmeyer* de 250 mL contendo meio de cultivo YM, permanecendo em *shaker* a 25 °C e 140 rpm, durante 48 h.

Tabela 8 - Composição do meio de cultura YM.

Componentes	Concentração (g L ⁻¹)
Glicose	10,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Peptona	5,0

3.4.2. Curva padrão

A curva padrão foi realizada segundo Kusdiyantini et al. (1998) adaptada. A concentração do inóculo foi determinada por absorvância a 620 nm, sendo este diluído até a absorvância do inóculo ser de 20%. Em balões volumétricos de 100 mL, numerados de 1 a 10, diluiu-se o inóculo em água destilada em proporções de 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10. Todas as diluições foram filtradas e o volume filtrado nos milipores previamente secos. Os filtros foram novamente secos em estufa a 50 °C por 1 h e, em seguida, resfriados em dessecador por 1 hora e pesados.

3.4.3. Condições de cultivo

A fermentação foi realizada em erlenmeyer de 250 mL contendo meio YM (Tabela 8) e mantidos em *shaker* a 150 rpm, 25 °C por 168h. O meio foi esterilizado a 121 °C durante 15 minutos. A concentração da biomassa foi estimada pela absorbância a 620 nm e a conversão para massa seca (g L^{-1}) foi realizada segundo a curva padrão de biomassa previamente determinada, segundo a descrição do item 3.4.2.

3.4.4. Determinação de açúcares totais

A determinação de açúcares totais foi realizada segundo Miller (1959). Para isso, a solução de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) foi preparada a partir uma solução de 3,5 – dinitrossalicílico com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH), fenol e metabissulfito de sódio. Uma solução de tartarato duplo de sódio e potássio e, uma solução padrão de concentração $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de glicose foi preparada. Uma curva padrão de concentração conhecida de glicose foi preparada segundo a Tabela 9.

Tabela 9 - Preparação das diluições da solução padrão de glicose $1,0 \text{ g L}^{-1}$.

Concentração de glicose (g L^{-1})	Volume de solução padrão de glicose (mL)	Volume de água destilada (mL)
0,10	1,0	9,0
0,20	2,0	8,0
0,30	3,0	7,0
0,40	4,0	6,0
0,50	5,0	5,0
0,60	6,0	4,0
0,70	7,0	3,0
0,80	8,0	2,0
0,90	9,0	1,0
1,00	10,0	0,0

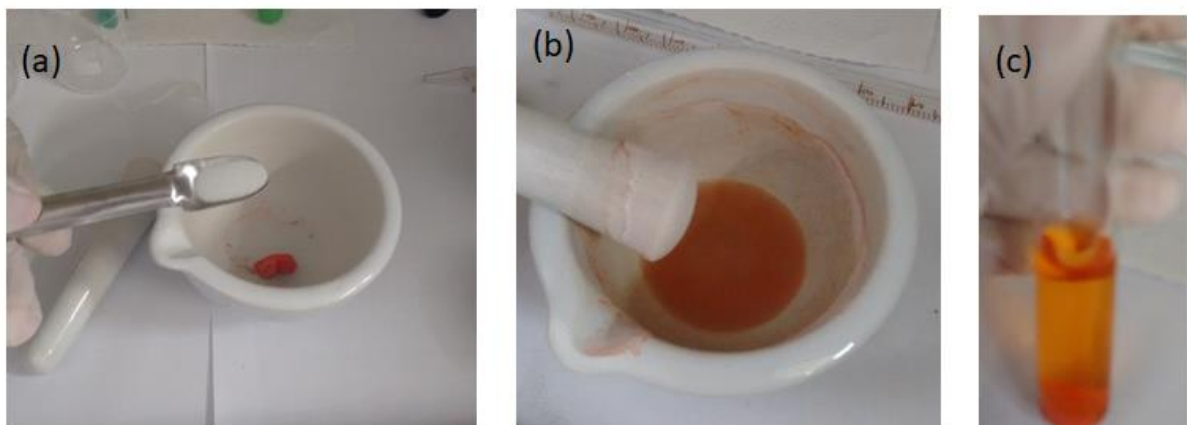
Para o preparo da amostra, 1 mL da amostra foi transferida para um tubo de ensaio, ao qual se adicionou 1 mL de solução DNS. O tubo foi aquecido em banho-maria a 100 °C por 5

minutos. Em seguida, foi resfriado em banho de gelo por 5 minutos. A absorvância das soluções foi lida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 546 nm.

3.4.5. Extração de carotenoides

Os carotenoides produzidos pelo microrganismo foram extraídos de modo exaustivo com uma combinação de solventes em almofariz e pistilo, seguida de centrifugação a 15.000 rpm durante 7 minutos, segundo Patias et al. (2017). Para isso, $0,20 \pm 0,02$ g de biomassa liofilizada foi macerada em almofariz e pistilo, acrescidas de $0,20 \pm 0,02$ g de pérolas de vidro e as extrações foram realizadas subsequentemente. Iniciou-se o processo de extração utilizando-se acetato de etila, em um total de 5 extrações com este solvente e, em seguida, foi realizado 1 extração com metanol (MeOH). A cada extração, um volume de 3 mL de solvente foi adicionado para o processo de maceração e, 7 mL de solvente foram utilizados para o processo de centrifugação. As extrações foram realizadas até o sobrenadante obter a tonalidade inicial da biomassa e, essa por sua vez, tornar-se branca. A Figura 11 ilustra as etapas iniciais de extração. A extração foi realizada para biomassa obtida nos seguintes tempos de cultivo: 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h.

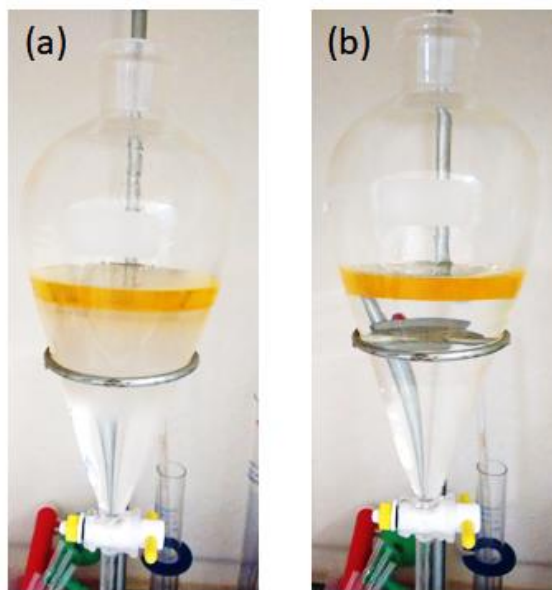
Figura 11 - Etapas iniciais da extração: (a) biomassa e adição de pérolas de vidro (b) biomassa acrescida do solvente e (c) biomassa e extrato após a etapa de centrifugação.



O sobrenadante obtido foi concentrado em rotaevaporador, em temperatura menor que 30 °C, ressuspensionado em uma combinação de éter de petróleo e éter de etila em uma proporção de 1:1 (v/v) e saponificado 16 horas *overnight* em 10% m/v de KOH/metanol.

Após a saponificação, foi realizado o processo de lavagem com água destilada (2 L) até a solução atingir pH 7,0, conforme Figura 12.

Figura 12 - Etapas da lavagem do extrato: (a) Etapa inicial, separação de fases. (b) Extrato puro.



Após o processo de lavagem, o extrato foi concentrado em rotaevaporador e mantido em $-37\text{ }^{\circ}\text{C}$ no escuro até a análise cromatográfica.

3.4.6. Quantificação e identificação dos carotenoides

Os carotenoides foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipada com bombas binárias (modelo LC-20AD), degaseificador on-line e injetor automático. O equipamento foi conectado em série a um detector PDA modelo SPD-M20A. UV- espectros visíveis foram obtidos entre 250 e 600 nm e os cromatogramas foram processados a 451 nm. A separação dos pigmentos foi realizada em coluna C30 YMC ($5\text{ }\mu\text{m}$, $250 \times 4,6\text{ mm}$) (Waters, Wilmington-DE, EUA). Antes de ser injetado na coluna, o extrato contendo pigmentos foi solubilizado em MeOH/éter metil-terbutil (MTBE) (70:30) e filtrado por meio de membranas Millipore ($0,22\text{ }\mu\text{m}$). A fase móvel consistiu em uma mistura de MeOH e MTBE. Um gradiente linear foi aplicado de 95:5 a 70:30 em 30 min, a 50:50 em 20 min. A taxa de fluxo foi $0,9\text{ mL min}^{-1}$. Os carotenoides foram identificados de acordo com as seguintes informações combinadas: ordem de eluição na coluna HPLC C30, cromatografia com padrões

autênticos, espectro visível no UV (λ max, estrutura fina espectral, pico de intensidade cis) e comparados com os dados disponíveis na literatura (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007; RODRIGUES et al., 2015; PATIAS et al., 2017).

Os carotenoides foram quantificados por HPLC-PDA, usando curva de calibração externas de all- *trans* - β - caroteno. O conteúdo total de carotenoides foi calculado como a soma do conteúdo de cada carotenoide individual separado na coluna C30.

3.4.7. Modelos matemáticos para curva de crescimento e consumo de substrato

Para avaliação dos modelos de crescimento para a levedura *P. rhodozyma*, alguns modelos presentes na literatura foram testados, conforme mostrado na Tabela 10. Os parâmetros, K_S e K_I , assim como K_x e m , presentes nessas equações foram estimados.

Tabela 10 - Modelos matemáticos para o crescimento da levedura *P. rhodozyma*.

	Equação		Referência
Crescimento			
Monod	$\mu = \mu_{max} \times \left(\frac{S}{K_S + S} \right)$	Equação 3	(MONOD, 1942)
Contois	$\mu = \mu_{max} \times \left(\frac{S}{(K_S \times X) + S} \right)$	Equação 4	(CONTOIS, 1959)
Andrews	$\mu = \mu_{max} \times \left(\frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_i}} \right)$	Equação 5	(ANDREWS, 1968)
Hiss	$\mu = \mu_{max} \times \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \times \left(\frac{K_i}{K_i + S} \right)$	Equação 6	(HISS, 2001)
Consumo de Substrato			Referência
Pirt	$\frac{dS}{dt} = - \left(\left(\left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} \right) + m \right) \times X \right)$	Equação 16	(PIRT, 1965)
Modelo Proposto	$\frac{dS}{dt} = \left(\left(\mu_{max,s} \times \left(\frac{X}{K_x + X} \right) \right) \times S \right) + m$	Equação 52	

Os parâmetros cinéticos obtidos experimentalmente são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 - Parâmetros cinéticos experimentais.

Experimento	Parâmetros cinéticos			
	$\mu_{máx,x}$ (d ⁻¹)	$\mu_{máx,s}$ (d ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (-)	$X_{máx}$ (g L ⁻¹)
1	0,0588	-0,0316	1,1842	13,4750
2	0,0611	-0,0318	1,2587	14,2666

3.4.8. Modelos matemáticos para obtenção de bioprodutos

Após determinar o melhor modelo para prever o crescimento e o consumo de substrato, tais equações foram utilizadas para determinar o melhor modelo de predição para a obtenção dos carotenoides totais, conforme Tabela 12.

Novamente, os dados experimentais descritos pela Tabela 11 foram utilizados para a estimação dos parâmetros da cinética do produto. Os dados do experimento 1 foram utilizados para a estimação dos parâmetros e do experimento 2 para a validação dos modelos com os parâmetros estimados.

Tabela 12 - Modelos matemáticos para a obtenção de carotenoides totais obtidos a partir da fermentação da levedura *P. rhodozyma*.

Equação		Referência
Obtenção para obtenção de bioprodutos		
Luedeking e Piret (1959)	$\mu_p = \alpha X + \beta$	Equação 17 (LUEDEKING et al., 1959)
Ghose e Tyagi (1979)	$\mu_p = \left(\mu_x \times \left(1 - \frac{P}{P_m} \right) \right)$	Equação 18 (GHOSE; TYAGI, 1979)

Apenas os parâmetros α , β e P_m foram estimados. Os parâmetros da curva de crescimento, assim como os do consumo de substrato foram estimados anteriormente no item 3.4.7.

3.4.9. Integração numérica e estimação dos parâmetros

Os parâmetros foram estimados usando a combinação híbrida dos algoritmos: PSO, para minimizar a função objetivo (apresentada pela Equação 53) e prever a melhor estimativa inicial dos parâmetros (POLI; KENEDY; BLACKWELL, 2007; PEDERSEN, 2010; MEZURAMONTES; COELLO COELLO, 2011) e o NLLS, juntamente com o algoritmo de *Trust – Region – Reflective* (MORÉ; SORENSEN, 1983; YUAN, 1998), para refinar a busca a partir da estimativa inicial provida pelo PSO. Todos os métodos computacionais foram realizados utilizando o software MatLab®, por meio das funções *particleswarm* e *lsqnonlin*.

A integração numérica das equações foi realizada utilizando a fórmula de Dormand-Prince (Dormand; Price, 1980) e determinada pela função *ode45* o software MatLab®. Os parâmetros foram estimados com IC 95% (LANE; DUMOUCHEL, 1994).

A análise estatística foi realizada avaliando-se o coeficiente de determinação (R^2) (Equação 28), soma dos erros quadráticos (*SSE*) (Equação 29) e o critério de informação de Akaike (*AIC*) (Equação 30).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. ESTUDO DE CASO 1: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO USO DE CAMPO MAGNÉTICO NO CRESCIMENTO DA MICROALGA *Spirulina* sp.

Parte dos resultados deste estudo de caso está publicada no periódico *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. O artigo é intitulado “*Modeling the growth of microalgae Spirulina sp. with the application of illuminance and magnetic field*”, DOI 10.1002/jctb.5942, publicado em 2019.

4.1.1. Efeito simultâneo do campo magnético e da iluminância

Os modelos matemáticos, mostrados na Tabela 3, para este estudo de caso foram baseados na equação de Verhulst (Equação 2), uma vez que, esta equação é usada na maioria dos modelos preditivos de crescimento de microrganismos (TSOULARIS; WALLACE, 2002; PELEG; CORRADINI, 2011). Cada equação proposta é uma versão parametrizada da equação de Verhulst, porém levando em consideração os efeitos da iluminância e do campo magnético no crescimento da microalga.

Equações que consideram os efeitos da iluminância, como por exemplo, Bannister (1979), Aiba (1982) e Grima (1993 e 1996), não foram comparadas neste trabalho porque a iluminância foi mantida constante nos experimentos. Utilizando estas equações e uma iluminação fixa, como é o caso deste estudo, a taxa de crescimento permaneceria constante, o que não acontece na prática.

Ambos os parâmetros K_i e K_M possuem as mesmas unidades de I e CM , respectivamente, para manter μ com a mesma unidade de μ_{max} . Assim, as unidades de K_i e K_M são $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e mT, respectivamente, e assim, μ tem a mesma unidade de μ_{max} (dia^{-1}).

A iluminância e o campo magnético representam fatores importantes na eficiência de conversão do substrato em biomassa, visto que afetam diretamente o cultivo de microalgas. Os valores dos parâmetros estimados, para cada equação proposta, são mostrados na Tabela 13 e indicam que a iluminância tem maior influência neste processo. Como K_i é pequeno, a relação I/K_i se torna maior que a relação CM/K_M , já que K_M tem um valor elevado em comparação ao valor de K_i . Devido à relação I/K_i ser maior que a relação CM/K_M , K_i apresenta maior influência do que K_M para afetar a magnitude de μ , como pode ser observado nas equações propostas que levam em consideração ambos os parâmetros.

Tabela 13 - Parâmetros estimados para cada modelo proposto.

Equação	Parâmetro	Valor
2	K_i	-
	K_M	-
32	K_i	230,2000
	K_M	2.100,2000
33	K_i	200,7000
	K_M	2.007,4000
34	K_i	22,9513
	K_M	569,4073
35	K_i	0,0000
	K_M	78,1648
36	K_i	212,0339
	K_M	-
37	K_i	182,0351
	K_M	-
38	K_i	-
	K_M	325,7298
39	K_i	-
	K_M	269,2670
40	K_i	22,1677
	K_M	-
41	K_i	0,0100
	K_M	-
42	K_i	-
	K_M	30,5842
43	K_i	-
	K_M	0,0100
44	K	97,7086
45	K_i	0,0101
	K_M	1,8432

O fato da iluminância apresentar maior impacto no crescimento de microalgas se deve ao fato dessas serem microrganismos fotossintetizantes, capazes de converter energia luminosa em energia química por meio da fotossíntese (CHISTY, 2007; BRENNAN; OWENDE, 2009; PIENKOS; DARZIANS, 2009; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; PRIYADARSHANI; RATH, 2012). Assim, para cultivar microalgas, é necessário fornecer luz para a realização da

fotosíntese (MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; MARKOU; VANDAMME; MUYLAERT, 2014).

As microalgas possuem capacidade de crescer e se adaptar a condições adversas (PIENKOS; DARZIANS, 2009; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010; PRIYADARSHANI; RATH, 2012). Dessa maneira, a aplicação de *CM* e, a aplicação de *CM* pode resultar em efeitos positivos no crescimento desses microrganismos.

O modelo projetado com cada equação proposta foi avaliado estatisticamente usando R^2 , *SSE* e *AIC* e os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Avaliação estatística das equações propostas no modelo projetado para prever o crescimento da microalga com iluminância e aplicação de *CM*.

Equação	Número de Parâmetros	R^2	<i>SSE</i>	<i>AIC</i>
2	0	0,9942	0,7269	-216,7878
32	2	0,9942	0,0568	-342,5188
33	2	0,9942	0,0568	-342,5299
34	2	0,9913	0,0756	-327,9687
35	2	0,9800	0,2145	-274,7781
36	1	0,9935	0,0602	-341,7190
37	1	0,9935	0,0602	-341,7190
38	1	0,9801	0,2487	-269,4166
39	1	0,9809	0,2367	-271,9232
40	1	0,9908	0,0818	-326,1273
41	1	0,9942	0,7282	-214,6142
42	1	0,6701	4,6074	-120,5306
43	1	0,7225	4,5638	-121,0150
44	1	0,9801	0,2487	-269,4154
45	2	0,9852	0,1949	-279,6665

Os melhores resultados de R^2 , como observado na Tabela 14, foram alcançados pelas Equações 2, 32, 33, 34, 36, 37, 40 e 41, todas próximas de 1, portanto esses resultados indicaram que os modelos propostos apresentam um bom ajuste dos dados. Na avaliação dos modelos, os

melhores valores de *SSE* foram obtidos para as Equações 32, 33, 30, 36, 37 e 36. Quanto ao *AIC*, as melhores Equações propostas foram 32, 33, 34, 36, 37 e 40.

Avaliando os 3 critérios estatísticos, R^2 , *SSE* e *AIC*, a Equação 33 é a melhor equação proposta e estes critérios confirmam que a equação de Verhulst (Equação 2) não é o melhor modelo para prever o crescimento de microalgas quando há aplicação de iluminância e campo magnético. Isso ocorre porque a equação de Verhulst limita-se apenas a descrever o crescimento de forma proporcional à população e a quantidade de recursos disponíveis. Dessa maneira, tal modelo não inclui fatores externos, tais como, a incidência da luz e a aplicação de *CM*. Portanto, para validar o modelo projetado para prever o crescimento de microalgas com aplicação de *I* e *CM*, foram utilizadas a equação de Verhulst (Equação 2) e as Equações 32 e 33.

A validação do modelo também foi avaliada de acordo com R^2 , *SSE* e *AIC*. Os resultados estão ilustrados na Tabela 15 e mostram o bom ajuste das equações propostas aos dados experimentais. Mais uma vez, há a corroboração de que a Equação 33 é a melhor equação proposta. Nas Figuras 13, 14 e 15, pode-se observar a comparação entre a Equação 33 e a equação de Verhulst com os dados experimentais utilizados para validar o modelo projetado para prever o crescimento das microalgas.

Tabela 15 - Avaliação estatística dos melhores modelos propostos em comparação com o modelo de Verhulst para prever o crescimento de microalgas quando há influência da iluminância e aplicação de *CM*.

Equação	R^2	<i>SSE</i>	<i>AIC</i>
2	0,9866	0,6432	-216,5165
32	0,9878	0,0922	-322,1231
33	0,9879	0,0918	-322,3035

O modelo proposto para prever o crescimento de microalgas, apresentou excelente ajuste aos dados experimentais, mesmo com dados experimentais ajustados na temperatura ($T = 35^\circ\text{C}$) diferente da utilizada na estimação de parâmetros ($T = 30^\circ\text{C}$), como pode ser visto nas Figuras 13, 14 e 15, o que demonstra que o modelo foi capaz de prever o crescimento do microrganismo, mesmo quando houve uma diferença de 5°C de temperatura no cultivo.

Figura 13 - Comparação entre os dados experimentais e as Equações 2 e 33 para a cinética de crescimento de microalgas sem aplicação de *CM*.

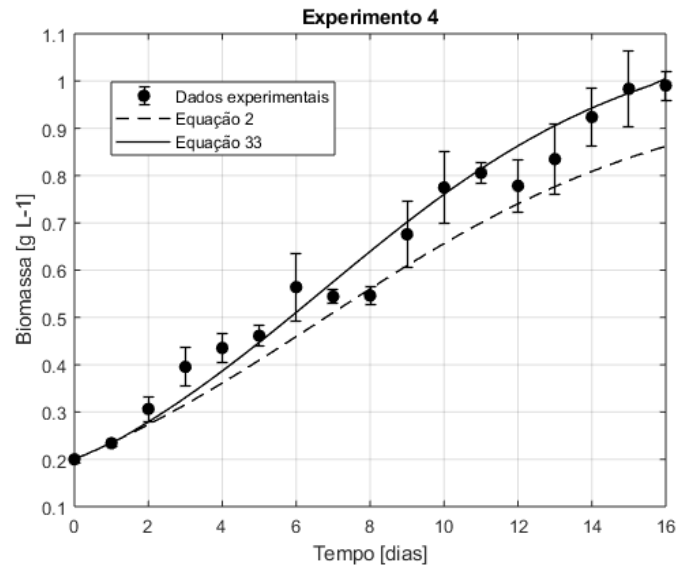


Figura 14 - Comparação entre os dados experimentais e as Equações 2 e 33 para a cinética de crescimento de microalgas com aplicação de *CM* de 30 mT.

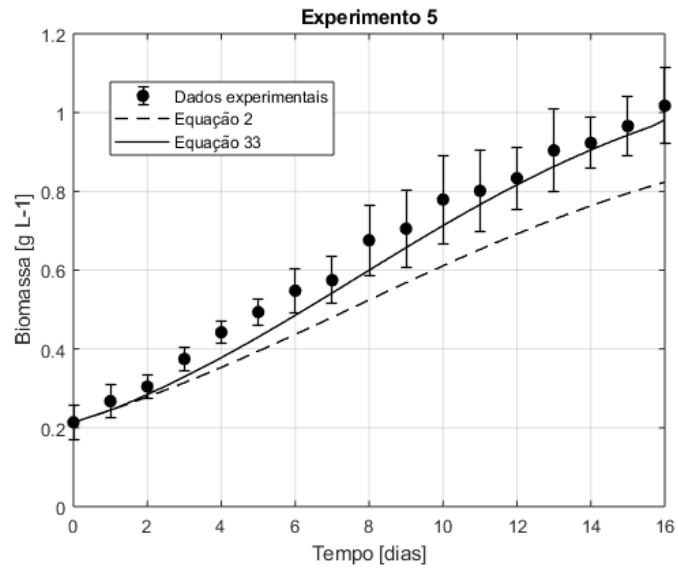
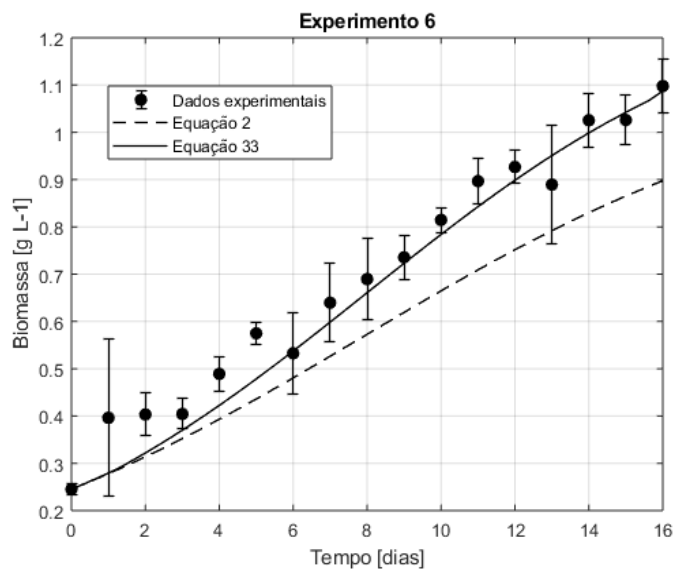


Figura 15 - Comparação entre os dados experimentais e as Equações 2 e 33 para a cinética de crescimento de microalgas com aplicação de CM de 60 mT.



Assim, através das Figuras 13, 14 e 15 e da Tabela 15, pode-se notar que a equação proposta (Equação 33) é a melhor para prever o crescimento de microalgas quando há aplicação de I e CM , em comparação com a equação de Verhulst. Os resultados mostraram que é necessário avaliar e adicionar os termos relacionados à I à equação, uma vez que estes possuem claramente uma elevada influência no processo e, além disso, há a necessidade de se adicionar os efeitos causados pelo CM , visto que também influenciam no processo de forma positiva.

4.1.2. Efeito da inibição pelo campo magnético

Os modelos propostos para avaliar o efeito a inibição pelo CM foram baseados, novamente na equação de Verhulst e nos modelos propostos anteriormente. A Tabela 16 mostra os valores dos parâmetros estimados para cada conjunto de experimentos.

Os valores obtidos para K_M e K_i são semelhantes aos valores encontrados na Tabela 13. Ambos os valores têm a mesma ordem de grandeza e, assim como estudos anteriores, o K_i é menor que K_M , uma vez que a afinidade pela luz é muito maior que a afinidade pelo campo magnético. Isso porque a luz é mais importante para o crescimento de microalgas, devido à realização da fotossíntese por este microrganismo (MATA, MARTINS, CAETANO, 2010; PRIYADARSHANI, RATH, 2012; MARKOU, VANDAMME, MUYLAERT, 2014).

Tabela 16 - Parâmetros estimados para avaliar o efeito da *I* e do *CM*.

Equação	Parâmetro	Valor
32	K_i	170,0335
	K_M	1289,5000
33	K_i	138,5338
	K_M	1275,9000
46	K_i	170,0335
	K_M	1289,5000
	K_{MI}	-2463,7000
47	K_i	138,5338
	K_M	1275,9000
	K_{MI}	-2768,7000
48	K_{MI}	-152,1627

Para esses ensaios, os valores foram menores que os obtidos anteriormente, no item 4.1.1. A diferença pode ser explicada para as diferentes condições experimentais, a concentração de nitrato foi diferente, fazendo com que, a aplicação de campos magnéticos atue de diferentes maneiras, de modo que o *CM* pudesse favorecer ou desfavorecer o crescimento do microrganismo.

O valor de K_{MI} é negativo, o que confirma a potencial inibição por *CM*. Assim como K_M , o K_{MI} é um valor maior do que K_i em magnitude, pois seu efeito é menor que o efeito da luz. O K_{MI} é maior que K_M neste estudo, devido ao efeito por inibição ser maior do que a afinidade por *CM*, segundo os dados experimentais.

Embora o crescimento de microalgas seja possível em condições adversas (CHISTY, 2007; PIENKOS, DARZINS, 2009; BRENNAN, OWENDE, 2009; MARKOU, VANDAMME, MUYLAERT, 2014), há a possibilidade de que o *CM* possa ter efeitos inibitórios sob determinadas condições experimentais.

Para verificação de qual modelo seria indicado para descrever o crescimento de microalgas submetidas à inibição por *CM*, foi realizada a avaliação estatística, por meio do R^2 e SSE , referente às equações que tratam da inibição. Os resultados da avaliação estatística são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17 - Avaliação estatística para as equações que predizem o crescimento de microalgas com inibição por *CM*.

Equação	R^2	<i>SSE</i>
46	0,9929	0,0566
47	0,9929	0,0559
48	0,9537	0,4301

Segundo a avaliação estatística, Tabela 17, a equação que melhor descreve a inibição por campo magnético é a Equação 47. Para corroborar com tal conclusão, a validação do modelo também comprova que o modelo proposto é o que descreve melhor o crescimento da microalga mediante inibição pelo *CM*, conforme Tabela 18 e a Figura 16.

Tabela 18 - Avaliação estatística da validação dos modelos projetados para predizer o crescimento de microalgas quando há influência de iluminância e *CM*.

Equação	R^2	<i>SSE</i>
2	0,9946	0,3442
32	0,9960	0,0234
33	0,9942	0,0333
46	0,9960	0,0230
47	0,9960	0,0221
48	0,9956	0,1231

A Figura 16 também demonstra que a equação proposta (Equação 47) é o melhor modelo para descrever o crescimento de microalgas submetidas à inibição por *CM*, uma vez que este é o modelo que mais se aproxima dos dados experimentais. É perceptível a ocorrência de inibição por *CM* em intensidade de 30 mT, uma vez que, quando comparada aos dados experimentais sem aplicação de *CM*, Figura 17, o crescimento do microrganismo é menor.

O modelo de projeto para prever o crescimento de microalgas demonstrou um excelente ajuste aos dados experimentais.

Figura 16 - Comparação entre os dados experimentais e as equações 47 e equação de Verhulst (Equação 2) para o crescimento da microalga com aplicação de CM de 30 mT.

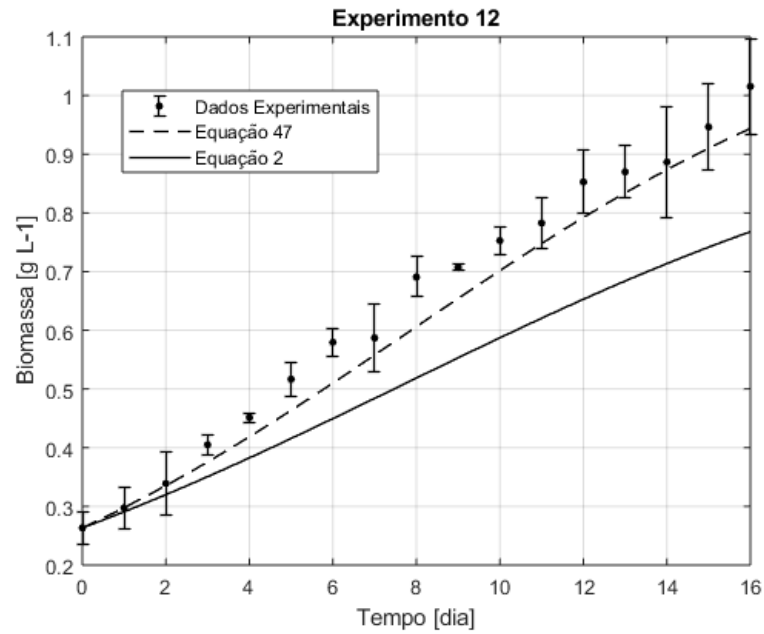
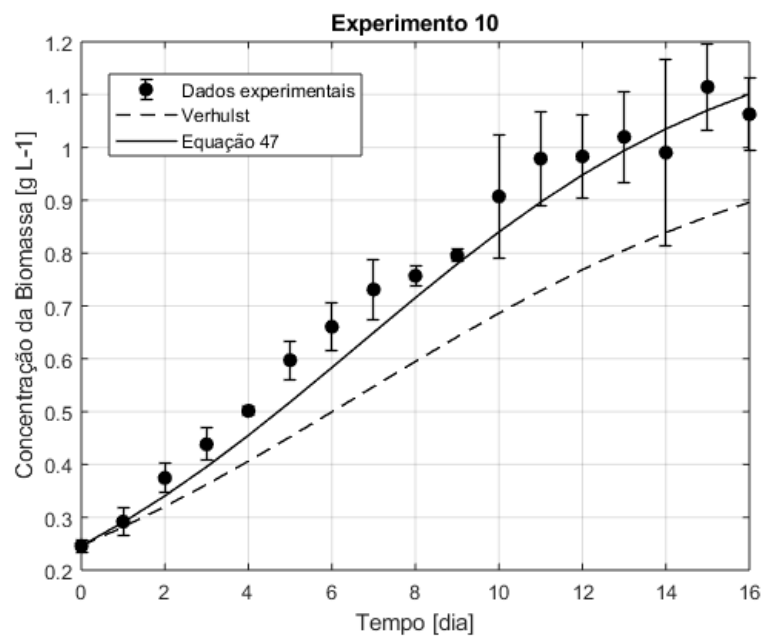


Figura 17 - Comparação entre os dados experimentais e as equações 47 e equação de Verhulst (Equação 2) para o crescimento da microalga sem aplicação de CM .



A possibilidade de ocorrer inibição ou estímulo de crescimento por *CM* é dada pela maneira como o campo atua sobre o microrganismo, ou seja, como o campo interage com ele. De acordo com Katz, Lioubashevski, Willner (2005), uma aplicação de *CM* na direção perpendicular à transferência de íons causa uma força magnética nos íons móveis. O fluxo hidrodinâmico resulta na diminuição da espessura da camada de difusão e acelera as espécies eletroativas de transporte de massa em direção à superfície do eletrodo. Desta forma, há a possibilidade de ocorrer a paramagnetização dos íons de metais de transição contidos nas enzimas por meio do *CME*, o que ocasionará no aumento da atividade das enzimas (TU et al., 2015). Alguns conjuntos enzimáticos podem ter suas transformações bioeletrocatalíticas afetadas pelo *CME*, através do aumento da transferência de elétrons na interface de eletrossolução (KATZ, LIOUBASHEVSKI, WILLNER, 2005; LI et al., 2011). Com isso, espera-se que possa acelerar o crescimento de microrganismos utilizando o *CM* (TU et al., 2015).

Mesmo que o crescimento possa aumentar com a aplicação de *CM*, há a possibilidade de ocorrer inibição por intensidade de campo. Hirano, Otha e Abe (1998), Wang, Zeng e Guo (2006), Li et al. (2007) e Tu et al (2015), relataram as mesmas conclusões que o presente estudo: sob certas condições experimentais, há uma gama de intensidades de *CM* que a inibição ocorre. No entanto, há um intervalo de intensidade de *CM* em que o crescimento e a obtenção de produtos não são inibidos.

Neste estudo, a inibição ocorre de forma mais perceptível, em *CM* com intensidade de 30 mT, conforme demonstrado pelos dados experimentais e dados do modelo, na Figura 16, quando comparada ao controle (sem aplicação de *CM*), Figura 17. Desta forma, é necessário estudar modelos matemáticos que possam determinar a inibição pelo campo magnético, a fim de garantir uma boa previsão dos dados experimentais.

4.2. ESTUDO DE CASO 2: AVALIAÇÃO DO EFEITO DO USO DE CAMPO MAGNÉTICO NO CRESCIMENTO DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae*

4.2.1. Redes neurais artificiais (ANN)

Para as ANNs que utilizaram a otimização de Levenberg-Marquardt (LM), os dados experimentais foram divididos de forma aleatória em 3 conjuntos: dados para treinar a rede (54 pontos), para a validação (12 pontos) e para teste (12 pontos). O método LM necessita de validação, visto que esta é utilizada como um meio de interromper previamente o treinamento caso o desempenho da rede não melhore ou permaneça o mesmo. O teste por sua vez, serve como uma verificação adicional de que a rede está ajustando o modelo de maneira adequada (HAGAN et al., 2014).

Por outro lado, para as ANNs que utilizaram a otimização de regularização Bayesiana (BR), os dados experimentais foram divididos de forma aleatória em 2 conjuntos: dados para treinar (66 pontos) e para teste (12 pontos). A otimização da regularização BR não requer dados para a validação, visto que possui sua própria maneira de validar incorporada ao algoritmo. Dessa forma, a metodologia empregada pela BR é baseada na minimização de uma combinação de erros lineares e pesos quadráticos como critério de parada do treinamento, eliminando assim a necessidade de realização da validação (BURDEN; WINKLER, 2008; HAGAN et al., 2014).

A escolha do número de neurônios e o número de camadas ocultas nem sempre é clara. Isso deve-se ao fato de que, a adição de novos neurônios pode acarretar na diminuição do erro do treinamento, o que pode ocasionar um excesso de ajuste além de fazer com que a predição da rede seja comprometida (BURDEN; WINKLER, 2008). Dessa maneira a escolha de número de neurônios e número de camadas ocultas é determinada pela tentativa e erro.

A análise estatística das configurações estudadas está disposta na Tabela 19. Pode-se perceber que a melhor configuração utilizando a otimização LM foi a configuração com 2 camadas ocultas e com 15 e 5 neurônios em cada camada, respectivamente, que apresentou valores de R e MSE de 0,9880 e 0,0031, respectivamente. Enquanto para a otimização BR, a melhor foi a configuração 9 com 2 camadas ocultas e 10 e 15 neurônios em cada camada, respectivamente, apresentando valores de R e MSE de 0,9894 e 0,0026, respectivamente.

Tabela 19 - Análise estatística das ANNs para todas as configurações e otimizações.

Configuração	Levenberg-Marquardt		Regularização Bayesiana	
		Média		Média
1	<i>R</i>	0,9840		0,9853
	<i>SSE</i>	0,4841		0,5181
	<i>MSE</i>	0,0039		0,0033
2	<i>R</i>	0,9829		0,9872
	<i>SSE</i>	0,3591		0,4642
	<i>MSE</i>	0,0042		0,0034
3	<i>R</i>	0,9784		0,9837
	<i>SSE</i>	0,4112		0,4677
	<i>MSE</i>	0,0055		0,0048
4	<i>R</i>	0,9860		0,9787
	<i>SSE</i>	0,3248		0,4936
	<i>MSE</i>	0,0034		0,0053
5	<i>R</i>	0,9809		0,9893
	<i>SSE</i>	0,3219		0,4318
	<i>MSE</i>	0,0045		0,0028
6	<i>R</i>	0,9800		0,9762
	<i>SSE</i>	0,3676		0,4932
	<i>MSE</i>	0,0048		0,0055
7	<i>R</i>	0,9819		0,9824
	<i>SSE</i>	0,3809		0,4710
	<i>MSE</i>	0,0044		0,0044
8	<i>R</i>	0,9794		0,9881
	<i>SSE</i>	0,3865		0,4415
	<i>MSE</i>	0,0057		0,0029
9	<i>R</i> ²	0,9872		0,9894
	<i>SSE</i>	0,3062		0,4754
	<i>MSE</i>	0,0031		0,0026

	R	0,9880	0,9856
10	SSE	0,3125	0,4804
	MSE	0,0031	0,0042
	R	0,9861	0,9798
11	SSE	0,3019	0,4876
	MSE	0,0034	0,0055
	R	0,9808	0,9858
12	SSE	0,3934	0,4360
	MSE	0,0047	0,0034

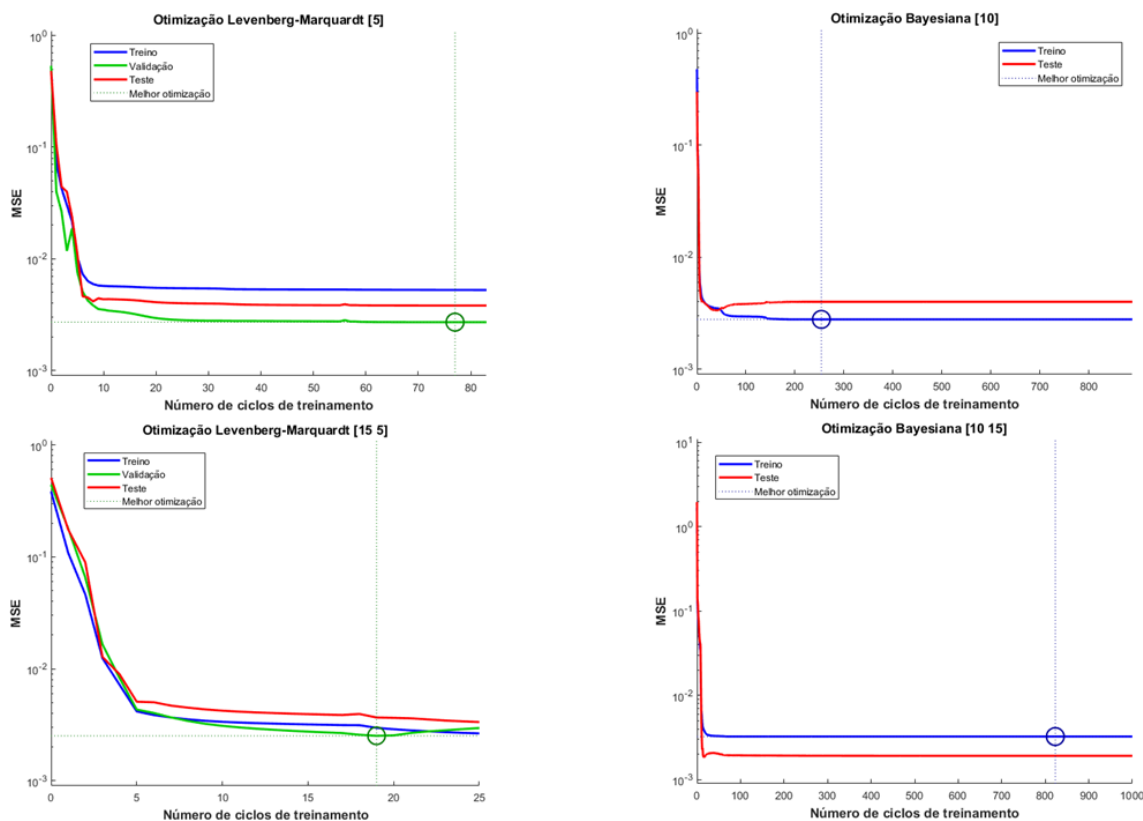
De modo geral, a melhor otimização foi determinada pela BR com uma configuração de duas camadas ocultas contendo 10 e 15 neurônios em suas respectivas camadas. Sabe-se que, o treinamento de uma ANN necessita de elevado número de iterações para atingir o mínimo erro do conjunto e, dessa maneira, muitas repetições fazem-se necessárias (BURDEN; WINKLER, 2008), como visto pela Figura 18. A otimização utilizando BR realiza um número maior de ciclos para minimizar o erro, chegando próximo a 1000 ciclos, enquanto a LM utiliza um número consideravelmente menor para a predição do modelo, tendo no máximo 80 ciclos.

Contudo, avaliando-se as otimizações por uma única camada oculta, neste estudo, a LM apresenta menor número de neurônios na camada oculta (5), o que proporciona maior desempenho por parte da rede. Isto porque, para a otimização LM, um número maior de neurônios pode ocasionar impraticabilidade do algoritmo (HAGAN et al., 2014), fazendo com que a otimização apresente menor previsibilidade da rede. Para a otimização BR, uma única camada oculta requer um número intermediário de neurônios (10), para resultar em uma melhor performance por parte da rede. O número requerido de neurônios é determinado na medida em que, o número de parâmetros efetivos para o modelo não seja afetado, visto que muitos pesos estarão próximos de zero (BURDEN; WINKLER, 2008).

Para corroborar com os resultados estatísticos, as Figuras 19 a 22, mostram os dados experimentais em relação aos valores preditos, ambos normalizados entre 0 e 1, para o conjunto de dados de treinamento, teste e validação para o caso da otimização LM, assim como os dados de treinamento e teste para a otimização BR. Os resultados demonstraram a mesma tendência para o treinamento e teste, o que demonstra a aplicabilidade das redes treinadas. Além disso, pode-se observar que os dados preditos e os dados experimentais para ambas as saídas

apresentam boa correlação, visto que os dados de treinamento e teste seguem a mesma tendência.

Figura 18 - Performance da ANN para as melhores configurações das redes.



Todavia, pode-se destacar que a variável de resposta pH apresenta a correlação menor se comparada com as demais variáveis em estudo. Os dados de treino e teste apresentam uma certa discrepância em relação a tendência dos pontos. Isso ocorre porque o pH ao longo do processo fermentativo tende a ser alterado, de acordo com o crescimento do microrganismo e com a obtenção de produtos metabólicos. Sabe-se que a variação de pH ao longo do cultivo pode afetar o processo fermentativo e possui uma faixa ótima que proporciona as melhores condições de crescimento. Dessa forma, para compensar a alteração do valor inicial o microrganismo tende a produzir metabólitos de forma a tentar manter o pH dentro de sua faixa ótima, como foi o caso deste experimento, em que a levedura *S. cerevisiae* manteve o pH sempre dentro da faixa 5,0 – 6,0, que é a sua faixa ótima de crescimento. Dessa maneira, como o microrganismo tenta regular o pH do ambiente, reduzindo a previsibilidade do modelo, isso faz com que sua correlação seja menor do que as outras variáveis.

As variáveis consumo de substrato, crescimento do microrganismo e produção de glutatona apresentaram os melhores ajustes. Visto que, diferentemente do pH, apresentam um comportamento característico em formato exponencial, independentemente das condições de cultivo. Desta forma, mesmo que o microrganismo seja submetido a condições de estresse, suas curvas de crescimento, consumo de substrato e formação de bioproduto, apresentarão sempre a mesma tendência característica. Por outro lado, o pH não apresenta um comportamento tão previsível quanto as demais variáveis.

Embora apresente um elevado potencial para predição de processos fermentativos, poucos estudos a respeito do uso de ANN foram desenvolvidos em bioprocessos. Alguns autores como Dach et al. (2016) e Zheng et al. (2017) relataram a eficiência das ANNs como ferramenta para estimar o comportamento dos processos fermentativos. Dach et al. (2016) estudaram o uso de ANN em bioprocessos para fazer a predição do nível de emissão de metano durante o processo de fermentação, por meio de digestão anaeróbia, de pasta de bovinos e suínos. As variáveis de entrada utilizada foram: dia de medição (dia), massa seca da pasta (%), matéria orgânica da pasta seca (%), pH e condutividade (mS), como variável de saída: teor de metano acumulado ($\text{m}^3 \text{t}^{-1}$). O estudo demonstrou que a ANN gerada é uma ferramenta eficiente para estimar a quantidade de metano produzido durante os processos de fermentação da pasta de bovinos e suínos. Zheng et al. (2017) avaliaram a modelagem e otimização de macronutrientes, microelementos e vitaminas adicionadas no cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* para obtenção de metoxi- ρ -benzoquinona e 2, 6-dimetoxi- ρ -benzoquinona (DMBQ) por meio de ANN combinada com o algoritmo genético. Sob a orientação do esquema otimizado, foi possível avaliar que várias interações entre nutrientes afetaram notavelmente o rendimento do produto.

Figura 19 - Valores previstos de dados normalizados versus dados experimentais normalizados usando otimização LM com uma única camada oculta e 5 neurônios.

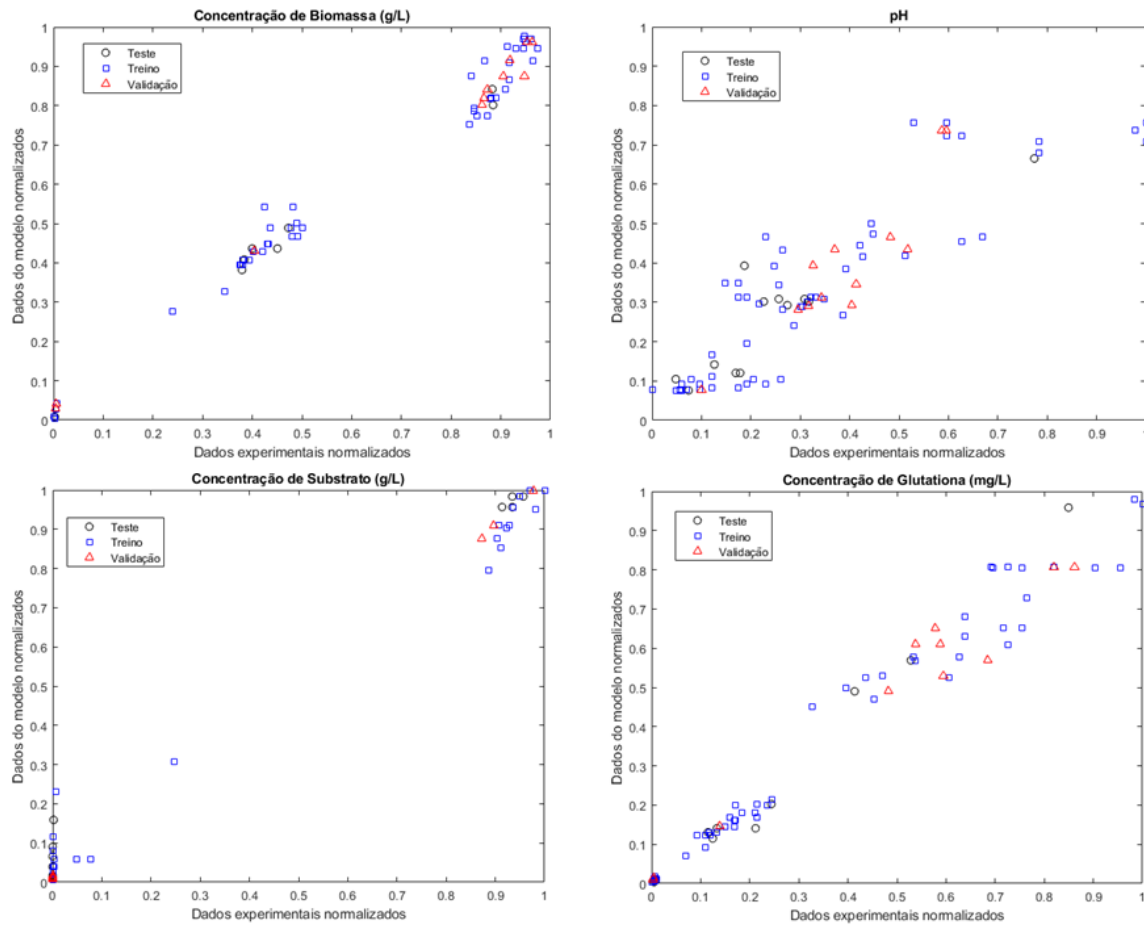


Figura 20 - Valores previstos de dados normalizados versus dados experimentais normalizados usando otimização BR com uma única camada oculta e 10 neurônios.

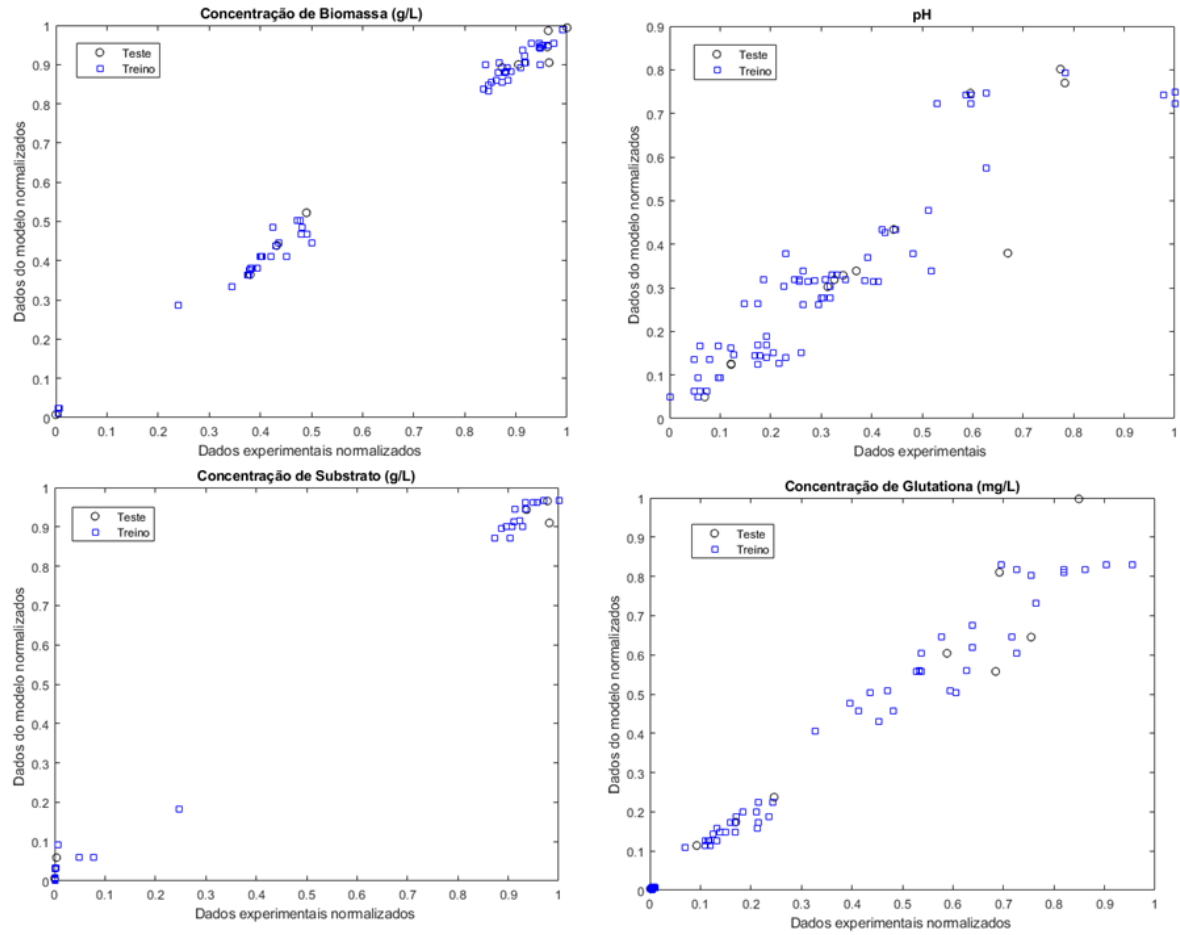


Figura 21 - Valores previstos de dados normalizados versus dados experimentais normalizados usando otimização LM com duas camadas ocultas [15 5].

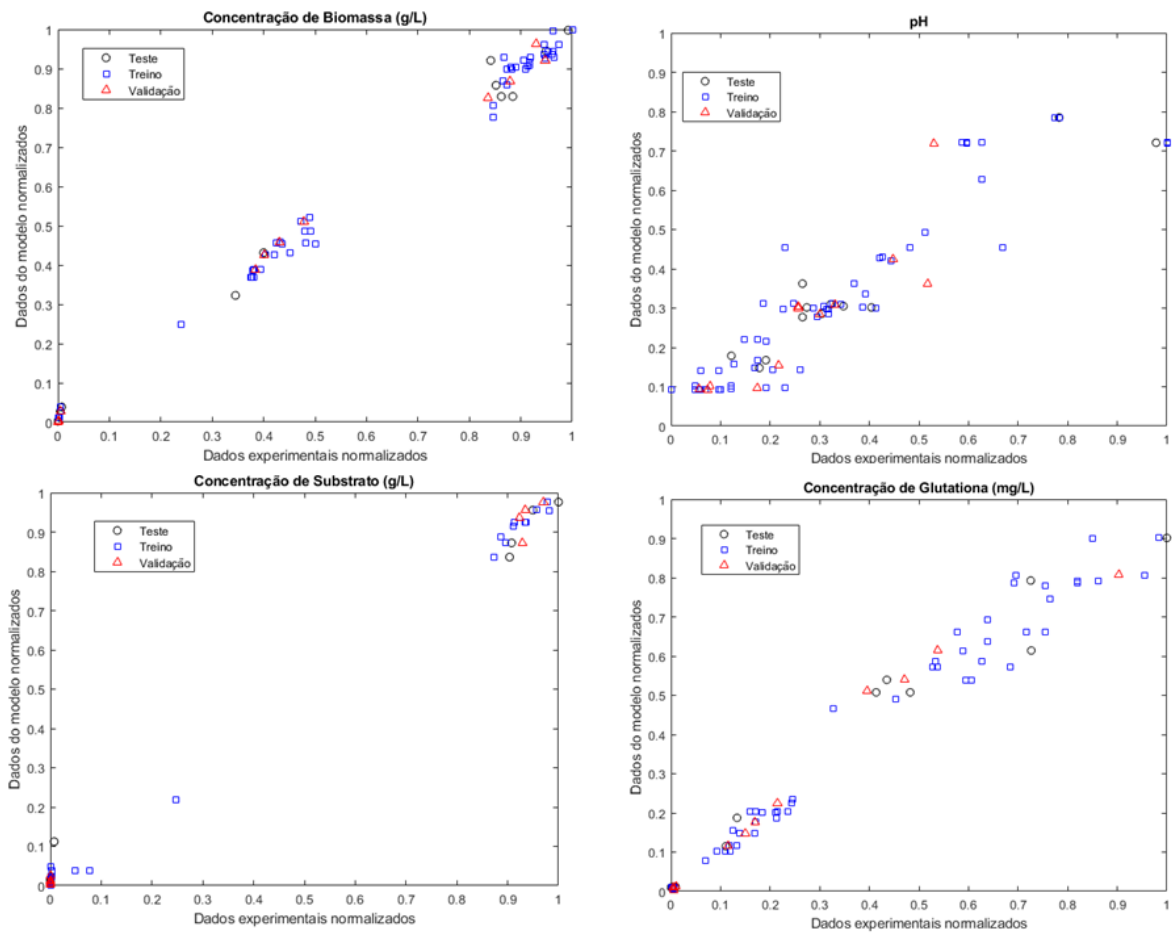
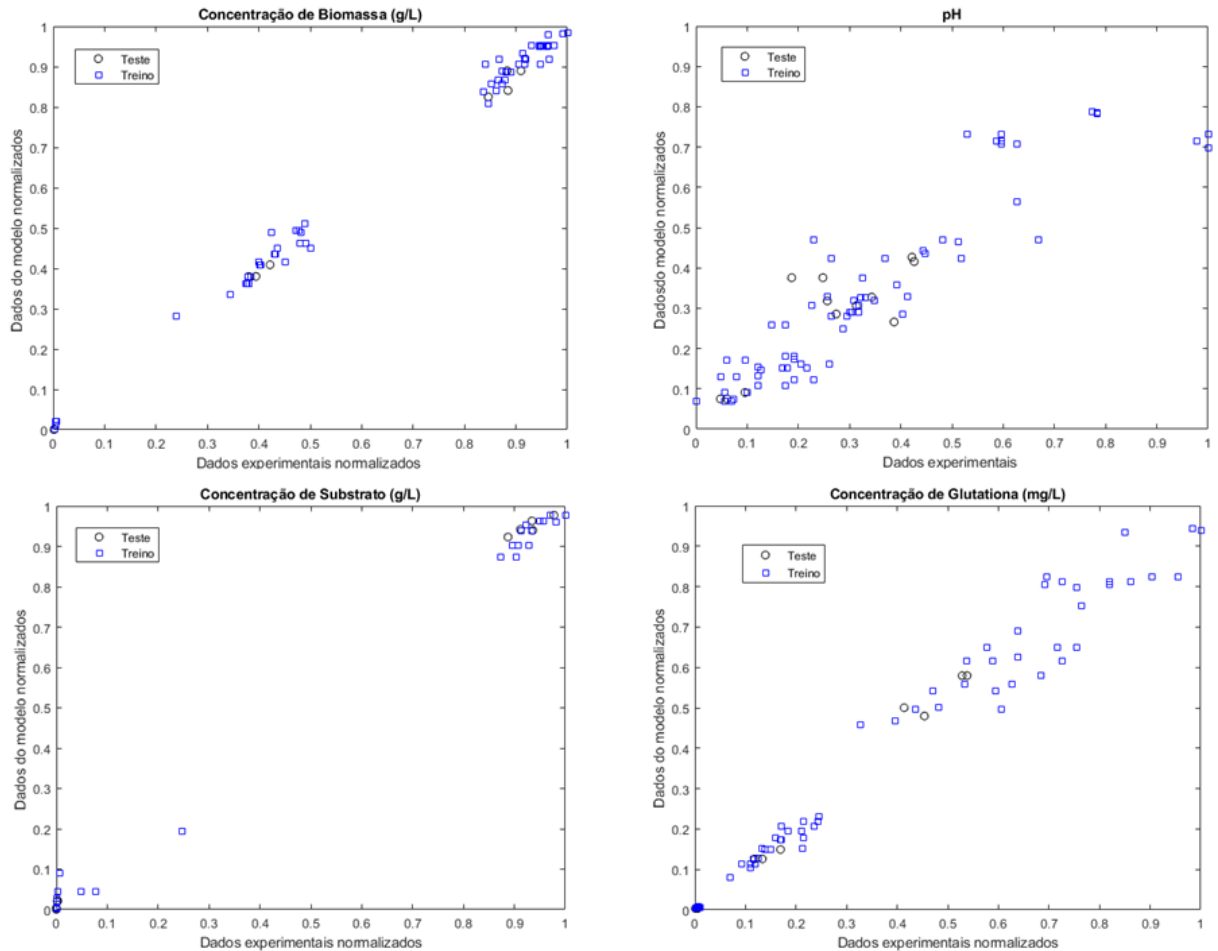


Figura 22 - Valores previstos de dados normalizados versus dados experimentais normalizados usando otimização BR com duas camadas ocultas [10 15].



O uso de redes neurais artificiais para descrever o comportamento do processo, mediante o efeito de todas as variáveis de entrada simultaneamente, apresenta elevado poder de predição. Diferentemente dos modelos cinéticos de microrganismos, em sua maioria baseados em equações empíricas que conseguem avaliar o efeito de poucos parâmetros de entrada de uma única vez, o uso de redes torna-se uma metodologia eficaz e viável, que permite avaliar o efeito de todas as variáveis como um todo, o que a torna ainda mais próxima às condições experimentais e fidedigna para prever o comportamento do sistema.

4.3. ESTUDO DE CASO 3 – MODELOS MATEMÁTICOS PARA DETERMINAÇÃO DO CONSUMO DE SUBSTRATO

4.3.1. Avaliação dos modelos matemáticos para o consumo de substrato

Neste estudo, os parâmetros do modelo proposto e da equação de Pirt (PIRT, 1965) foram ajustados pelo conjunto de dados experimentais do processo fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os parâmetros estimados para cada processo fermentativo são apresentados na Tabela 20. Os valores de K_S e K_x apresentaram a mesma ordem de grandeza, pois são parâmetros complementares e representam a interação entre o microrganismo e o substrato. Os valores estimados de K_S e K_x têm as mesmas unidades de S e X , respectivamente, para manter μ_x com a mesma unidade de $\mu_{max,x}$ e μ_S com a mesma unidade de $\mu_{max,S}$.

Tabela 20 - Parâmetros estimados para o modelo proposto e a equação de Pirt (Pirt, 1965).

Equação	Parâmetros Estimados		
	K_S	K_x	m
52	$1,2450 \pm 0,7395$	$0,9357 \pm 0,1642$	$1,6821 \times 10^{-13}$ (IC não significativo)
	K_S	$Y_{x/s}$	m
16	$0,3876 \pm 9,8894$	$0,1238 \pm 0,1332$	$4,4404 \times 10^{-13}$ (IC não significativo)

Quanto menores os valores de K_S e K_x , maior a taxa de crescimento de microrganismos e o consumo de substrato e maior será a inclinação das curvas devido à relação numerador/denominador. Assim, quanto menor o denominador, maior o valor resultante da divisão entre os parâmetros. Quanto menor o valor de K_S e K_x , maior será a fase exponencial de ambas as curvas cinéticas.

Conforme mostrado pelo intervalo de confiança (IC) da variável m , este não tem muita relevância para ambas as Equações 52 e 16, visto que, para ambos intervalos superior e inferior, apresentam o mesmo valor com sinais contrários, o que demonstra que pode ser negligenciado. Vale ressaltar também que a quantidade de substrato destinada a manutenção dos microrganismos (m), quando comparada à destinada para a geração de novas células é um valor muito pequeno, conforme mostrado pela Tabela 20, o que indica que o mesmo parâmetro pode, em alguns casos, ser desconsiderado.

O *IC* para os parâmetros da equação de Pirt (Equação 16) demonstra que esta não apresenta parâmetros confiáveis, visto que o *IC* para cada parâmetro é maior que o valor do próprio parâmetro. O modelo proposto, por outro lado, apresenta *IC* menor que o valor do parâmetro obtido, indicando uma confiabilidade nos mesmos.

A Tabela 21 mostra que os melhores valores de R^2 foram obtidos com o modelo proposto, ou seja, os valores de R^2 ficaram próximos de 1. Além disso, os menores valores de *SSE* e *MSE* também foram obtidos pelo modelo proposto. O modelo com o menor *AIC* é o melhor modelo (Akaike, 1974; Bozdogan, 2000), portanto, o modelo proposto é o melhor modelo para descrever os processos fermentativos escolhidos como estudos de caso deste trabalho.

Os resultados estatísticos da estimação de parâmetros são corroborados pela avaliação da validação dos modelos (Tabela 21).

Tabela 21 – Avaliação estatística para o modelo proposto e modelo de Pirt para prever o consumo de substrato e para a validação.

Equação	Avaliação Estatística			
	R^2	<i>SSE</i>	<i>AIC</i>	<i>MSE</i>
52	0,9925	103,6052	44,4524	62,7743
16	0,9167	1,2962x 10 ³	125,3042	5,6730x10 ³

Equação	Avaliação Estatística		
	R^2	<i>SSE</i>	<i>AIC</i>
52	0,9893	162,0636	51,9121
16	0,9042	1,5013x 10 ³	123,1473

Os resultados da análise estatística (Tabela 21) assim como as Figuras 23 e 24 confirmam que a equação de Pirt (Equação 16) não pôde prever com precisão a curva cinética tanto do crescimento do microrganismo quanto da concentração do substrato sob alta taxa inicial de consumo de substrato.

O modelo proposto, pôde prever com precisão os primeiros pontos da curva cinética do consumo de substrato. Consequentemente, também pode prever a curva cinética de crescimento do microrganismo, uma vez que leva em consideração a co-dependência entre as duas curvas cinéticas.

Figura 23 - Comparação entre os dados experimentais, modelo proposto e equação de Pirt, para a cinética de crescimento de *S. cerevisiae* para a validação do modelo (experimento 2), utilizando-se a equação de Monod para o crescimento.

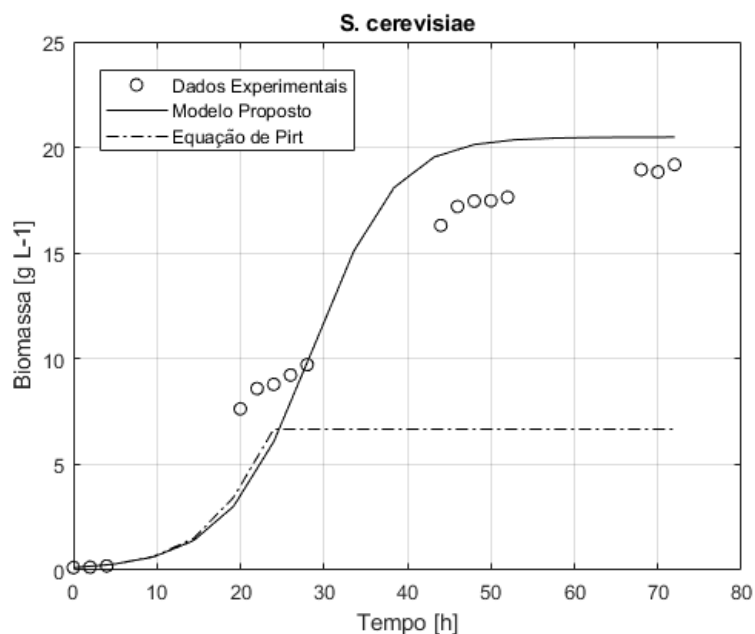
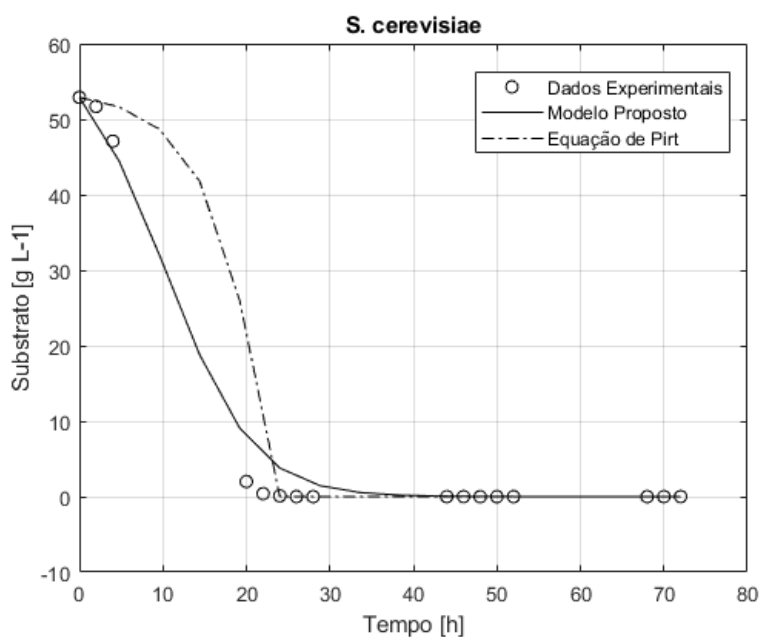


Figura 24 - Comparação entre os dados experimentais, modelo proposto e equação de Pirt, para a cinética de consumo de substrato de *S. Cerevisiae* para a validação do modelo (experimento 2), utilizando-se a equação de Monod para o crescimento.



Pode se dizer que o modelo proposto é indicado para fermentações submersas. Em fermentações submersas, como é o caso do processo fermentativo alvo deste estudo, o microrganismo é envolvido pelo substrato e o contato entre o microrganismo e o substrato ocorre em todas as direções, o que causa forte interação. Além disso, os nutrientes são mais facilmente disponíveis nas fermentações submersas e as transferências de calor e massa são rápidas e mais facilmente controladas (PRABHAKAR et al., 2005; PANDEY; SOCCOL; LARROCHE, 2008; VINIEGRA-GONZALEZ, 2013; BARRAGÁN et al., 2016).

Dessa forma, a curva cinética de consumo de substrato nem sempre pode ser representada pela equação de Pirt. Isto porquê, a equação de Pirt não leva em consideração a interação entre o microrganismo e substrato. Pode-se destacar que a equação de Pirt é indicada apenas para fermentações em estado sólidas, uma vez que, nesse processo fermentativo, a interação entre o microrganismo e substrato é limitada, porque o contato entre ambos ocorre apenas em uma direção - na superfície sólida.

Outro ponto a ser levado em consideração é que a relação entre o crescimento microbiano e o consumo de substrato é complexa demais para ser descrita em termos de leis físicas (MAHANTA; BORAH; SAIKIA, 2014) e nem sempre modelos simples como Pirt conseguiriam representar fidedignamente o comportamento do processo. Finalmente, pode-se concluir pelos resultados deste trabalho que a principal vantagem da equação proposta é avaliar os termos relacionados à interação entre o microrganismo e o substrato para predizer as duas curvas cinéticas: crescimento de microrganismos e consumo de substrato.

4.4. ESTUDO DE CASO 4 – MODELOS MATEMÁTICOS PARA DETERMINAÇÃO DA OBTENÇÃO DE PRODUTOS METABÓLICOS

4.4.1. Carotenoides: extração e identificação dos pigmentos

A Tabela 22 e a Figura 25 contém a identificação e o perfil dos carotenoides obtidos por meio do processo fermentativo. O perfil qualitativo dos carotenoides manteve-se ao longo de todo o processo fermentativo para ambos os experimentos, variando-se apenas quantitativamente ao longo do tempo, os demais cromatogramas encontram-se dispostos no Apêndice A. Foram identificados 6 carotenoides. Todos os pigmentos identificados são carotenos com conformações diferentes (*cis* e *trans*). Não houve presença de xantofilas e derivadas, visto que, grande parte dos pigmentos obtidos são carotenos.

Grande parte dos carotenoides apresentam uma estrutura básica composta por hidrocarbonetos, ligados linearmente e de modo a deixar a molécula simétrica, com a ordem invertida no centro, possuindo assim um carbono quiral, o que possibilita a formação de isômeros (JOHNSON; SCHROEDER, 1995; VACHALI; BHOSALE; BERNSTEIN, 2012; MEZZOMO; FERREIRA, 2016; CARDOSO et al., 2017; SOROUR et al., 2017). Dessa forma, conforme mostrado pela Tabela 22, houve presença de isômeros *cis* e *trans*.

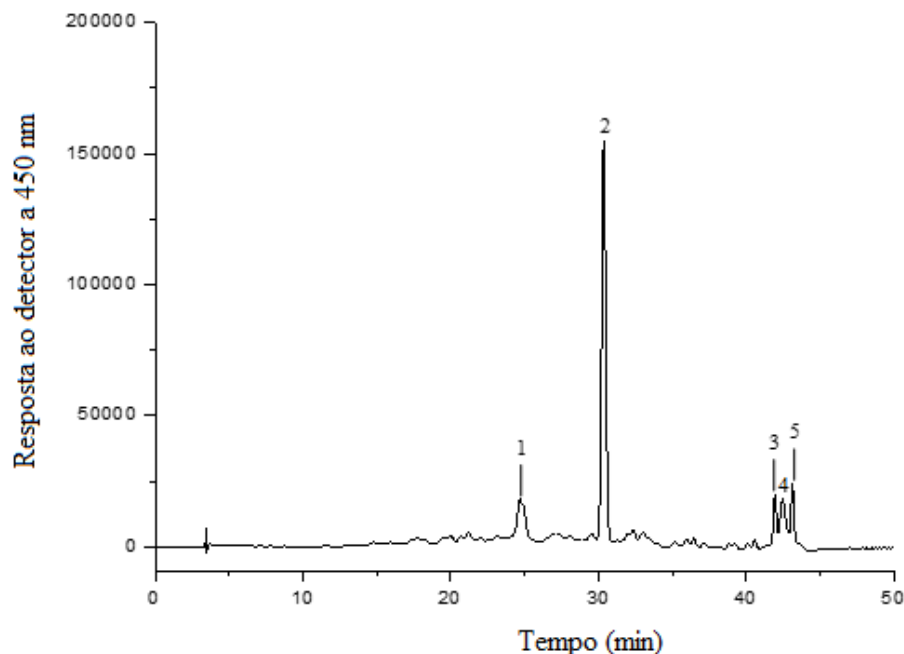
Tabela 22 - Identificação dos pigmentos obtidos por meio do processo fermentativo da levedura *P. rhodozyma*.

Pico ^a	Carotenoide	t _R (min) ^b	Características UV-Vis		
			λ _{max} (nm) ^c	III/II (%) d	A _B /II (%) e
1 ^f	<i>cis</i> -carotenoide	24.6	333,414,446,468	25	30
2	<i>all-trans</i> -β-caroteno	30.2	425,450,475	25	-
3	9- <i>cis</i> -β-caroteno	31.1	339,416,438,465	28	9
4	<i>all-trans</i> -β-zeacaroteno	36.4	406,427,453	60	-
5	<i>all-trans</i> -γ-caroteno	41.9	434,461,490	42	-
6 ^f	9- <i>cis</i> -γ-caroteno*	42.6	307,457,486,517	42	22

^aNumerados de acordo com os cromatogramas mostrados na Figura 25 ^bt_R: Tempo de retenção na coluna C₃₀.

^cGradiente linear do Metanol: MTBE. ^dEstrutura fina espectral: Proporção da altura do pico de absorção de comprimento de onda mais longo (III) e da altura do pico de absorção médio (II). ^eRelação entre o pico *cis* (A_B) e o pico médio de absorção (II). ^fIdentificado. * Ocorrência no início da fermentação.

Figura 25 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenóide de *Phaffia rhodozyma* para 168 h de fermentação.



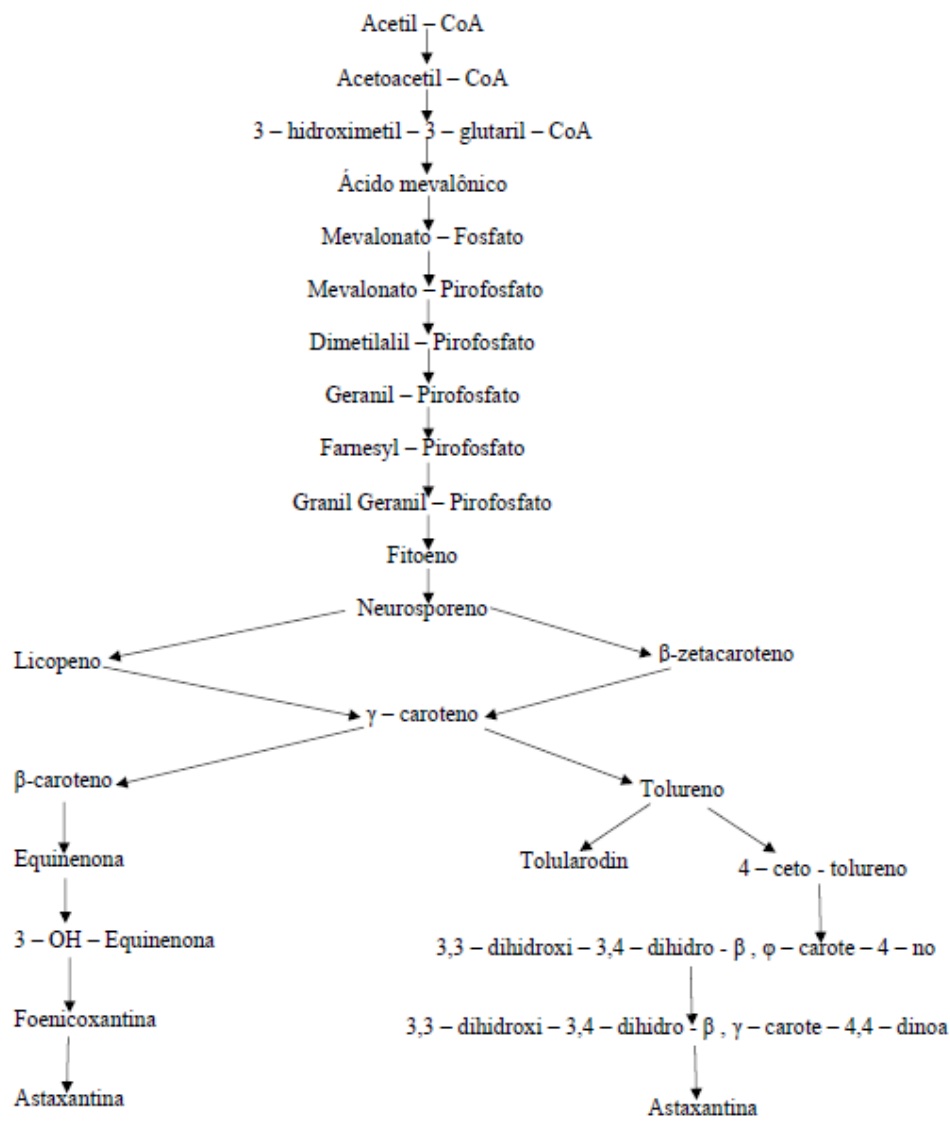
O principal pigmento produzido pela *P. rhodozyma* é a astaxantina (ANDREWS; PHAFF; STARR, 1976; PHAFF, 1986A; PHAFF, 1986B; JOHNSON, 2003; FRENGOVA; BESHKOVA, 2009) e a rota metabólica para a sua obtenção é mostrada pela Figura 26. Entretanto, como mostrado pela Tabela 22, neste estudo não houve a produção desta xantofila. A não produção do pigmento majoritário deste microrganismo pode ter ocorrido devido às condições experimentais, pois a produção de carotenóides é diretamente dependente da linhagem da espécie e fortemente influenciada pelas condições de cultivo (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009). Como o inóculo passou por uma condição de estresse através de uma rápida variação de temperatura, indo de 35 °C a 4 °C em questão de poucas horas, há a possibilidade de ter ocorrido mutação e/ou uma resposta a esse estresse, de forma que a rota metabólica fosse alterada e, conseqüentemente, fossem alterados também os produtos metabólicos.

As etapas metabólicas para a produção de pigmentos por meio desta levedura envolvem: formação de fitoeno a partir de geranyl geranyl pirofosfato, desidrogenação de fitoeno em licopeno, ciclização de licopeno em β -caroteno e oxidação deste último em astaxantina, conforme mostrado na Figura 26. Entretanto, no presente estudo, há a possibilidade de ocorrência de uma inibição na etapa de oxidação de β -caroteno à astaxantina, o que pode ter

feito com que a rota metabólica fosse alterada, conforme mostra a Figura 27, visto que não há indícios de produção de astaxantina, indicando que a oxidação de β -caroteno de fato não ocorreu. Outros autores, como Girard et al. (1994), relataram também em seus estudos a não produção de astaxantina pela *P. rhodozyma*. No estudo de Girard et al. (1994) houve aumento de cinco vezes na acumulação de β -caroteno para uma cepa de *P. rhodozyma* que sofreu mutação ao longo do processo fermentativo, quando comparada a cepas que não passaram por mutação. Os autores relatam que, provavelmente, a mutação sofrida possa ter bloqueado a etapa de oxidase, o que impossibilitou a formação de astaxantina. Urnau et al. (2019) utilizando resíduos agroindustriais para cultivo de *P. rhodozyma*, obtiveram um perfil de carotenoides similar ao encontrado neste estudo. Os carotenoides encontrados pelos autores neste estudo, foram (13Z)- β -caroteno, (all-E)- β -caroteno (produto majoritário), (9Z)- β -caroteno e γ -caroteno.

Tais estudos demonstram que, as condições de cultivo influenciam diretamente no produto metabólico a ser obtido ao longo do processo fermentativo. Um outro fator que pode ter influenciado a alteração da rota metabólica é a incidência de luz durante o processo, visto que a formação de carotenoides em muitos microrganismos é regulada pela luz. Isso faz com que a intensidade luminosa tenha influência não apenas no quantitativo dos carotenoides, mas também no qualitativo (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009). Cabe salientar que no presente estudo a iluminação não foi controlada. An e Johnson (1990) relataram que a exposição da levedura *P. rhodozyma* a elevadas intensidades luminosas em meio sólido resultou em inibição de crescimento e, conseqüentemente, diminuição da síntese de carotenoides, alterando a composição dos pigmentos, havendo um aumento na produção de 3-zeacaroteno, enquanto a produção de 3-caroteno e de xantofilas, como astaxantina, fenenoxantina e 3-hidroxi-3', 4'-didesidro-3, W-caroten-4-ona, diminuíram. O estudo realizado por Vázquez (2001) com *P. rhodozyma*, concluiu que, a intensidade luminosa afeta as concentrações totais de carotenoide, assim como o perfil dos pigmentos e as concentrações de biomassa e de xilitol.

Figura 26 - Via metabólica partindo do acetil - CoA até a formação da astaxantina para a espécie de levedura *P. rhodozyma*.

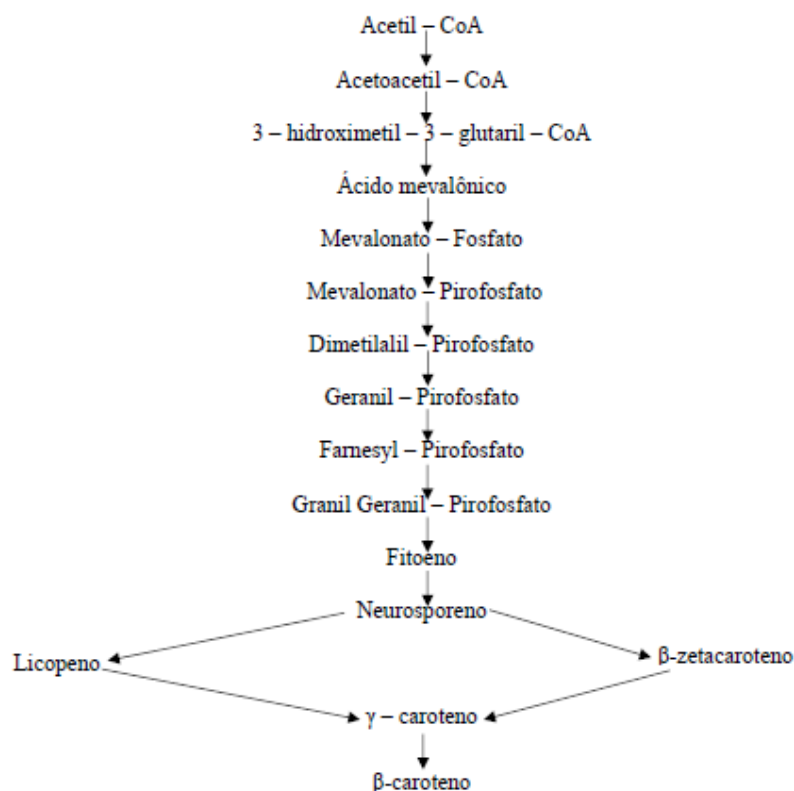


Fonte: (Frengova; Beshkova, 2009 adaptada).

Os dois experimentos realizados com a *P. rhodozyma* (Tabela 23) apresentaram o mesmo perfil de carotenoides, visto que, para ambos as condições experimentais foram idênticas, divergindo apenas na questão quantitativa. Isso porque o experimento 1 apresentou menor concentração de biomassa quando comparado ao experimento 2. Como os pigmentos

produzidos estão no interior da célula, estão diretamente relacionados com a concentração de biomassa, quanto maior a concentração de biomassa, maior será a concentração do produto.

Figura 27 - Possível via metabólica partindo-se do Acetil – CoA até a formação de β – caroteno para o processo fermentativo em estudo utilizando a *P. rhodozyma*.



O pigmento majoritário produzido em ambos os experimentos foi o all-*trans*- β -caroteno, o qual apresentou as maiores concentrações. Por outro lado, embora o 9-*cis*- β -caroteno tenha sido identificado ao longo do processo fermentativo, este teve sua concentração extremamente reduzida ao fim do processo fermentativo, de modo que não foi possível quantificá-lo em 168 h de fermentação.

Como os carotenoides apresentam uma estrutura básica, estes podem sofrer modificações devido à alta reatividade das ligações duplas conjugadas, tornando a molécula suscetível a isomerização e degradação oxidativa (MEZZOMO; FERREIRA, 2016; MASSOUD, KHOSRAVI-DARANI, 2017). Dessa forma, a baixa concentração, ou isenção da presença do 9-*cis*- β -caroteno, deve ter ocorrido porque este pode ter sido degradado ao fim do processo e/ou convertido em outro pigmento.

Os carotenoides produzidos por esse microrganismo são produtos intracelulares (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009), há a necessidade de extrair os pigmentos do interior da célula para o meio externo. Comumente, diversos autores utilizam técnicas de extração por solvente, sendo o principal o DMSO (dimetilsulfóxido), alguns ainda utilizam extração enzimática e/ou extrações que combinam processos físicos e químicos. Neste estudo, diferentemente do que se utiliza na literatura, optou-se pela metodologia da extração exaustiva, que trata de um processo físico com concomitante processo químico: utiliza-se a combinação do processo de maceração e dois solventes: acetato de etila e metanol.

Tabela 23 - Caracterização quantitativa dos carotenoides produzidos pela *P. rhodozyma* em 168h de fermentação.

Carotenoide	Experimento 1	Experimento 2
<i>cis</i> -carotenoide	28,54	31,27
<i>all-trans</i> - β -caroteno	234,30	176,70
<i>9-cis</i> - β -caroteno	Não detectado	Não detectado
<i>all-trans</i> - β -zeacaroteno	30,85	17,88
<i>all-trans</i> - γ -caroteno	32,97	29,13
<i>9-cis</i> - γ -caroteno	18,19	23,56
Total ($\mu\text{g g biomassa seca}^{-1}$)	279,00	344,84
$X_{m\acute{a}x}$ (g L^{-1})	13,47	14,27

A metodologia empregada para extração e purificação dos pigmentos mostrou-se uma técnica viável e proporcionou um extrato isento de impurezas, conforme Figura 25, pois o cromatograma não apresenta ruídos. A Tabela 24 apresenta uma comparação entre a quantificação total de carotenoides por meio de outras técnicas de extração. Percebe-se que o uso de rompimento celular com abrasão (por meio de uso de pérolas de vidro) com concomitante extração com solventes combinados, proporciona resultados satisfatórios.

Michelon et al. (2012) realizaram experimento similar utilizando abrasão com pérolas de vidro com uso de um único solvente e seu resultado final foi 3 vezes menor que o obtido com combinação de solventes. Outro ponto que pode ser destacado pela Tabela 24 foi que o uso de DMSO para a extração apresentou um resultado de carotenoides totais menor, quando comparado à técnica adotada no presente estudo. Vale ressaltar que o estudo desenvolvido por

Michelon et al. (2012) foi realizado em meio de cultivo diferente, o que pode indicar menor obtenção de produto.

Tabela 24 - Comparação de diferentes técnicas de extração de carotenoides.

Técnica de Extração	Biomassa utilizada (g)	Carotenoides totais ($\mu\text{g g de biomassa seca}^{-1}$)	Técnica de purificação	Referência
Maceração com terra de diatomáceas + acetona	0,5	93,13		
Abrascão com pérolas de vidro + acetona	0,5	75,42	1	MICHELON et al., 2012
Ondas ultrassônicas + acetona	0,5	79,20		
Imersão em nitrogênio líquido + acetona	0,5	82,05		
DMSO	0,05	155,72		
Abrascão com pérolas de vidro + acetato de etila + metanol	0,2	279,00	2	Este trabalho

¹10 mL de NaCl a 20% (m/v) e 10 mL de éter de petróleo e a fase éter foi filtrada através de sulfato de sódio.

²Combinação de éter de petróleo e éter de etila em uma proporção de 1:1 (v/v) e, saponificado 16 horas *overnight* em 10% w/v de KOH/metanol.

Vale salientar que a metodologia de purificação adotada difere do tradicionalmente utilizado para o microrganismo em estudo. A técnica aqui adotada foi uma maneira de testar a redução de possíveis perdas de pigmentos, visto que, na saponificação, os pigmentos ficam concentrados em uma fase orgânica e a separação é feita por diferença de densidade. Enquanto na metodologia tradicional, realiza-se filtração por meio de sulfato de sódio e, em alguns casos, há a retenção de pigmentos no sólido, sendo necessário o uso de solvente para a possível retirada dos carotenoides, o que, mesmo assim, ainda pode ocasionar perdas.

Como o produto obtido é em grande parte destinado a indústria de alimentos e farmacêutica, a presença de compostos tóxicos, possivelmente derivados do DMSO, no extrato dos pigmentos torna-se inviável, segundo a legislação existente para alimentos e fármacos, a

aplicação dessa técnica em escala industrial (MICHELON et al., 2012). Isso faz com que, a metodologia proposta para extração dos carotenoides seja uma técnica a ser explorada, visto que o uso de combinação de solventes menos tóxicos a torna uma alternativa viável. Além disso, o uso de processos enzimáticos para a extração dos carotenoides resulta no encarecimento do processo, o que também o torna inviável para escala industrial.

4.4.2. Modelagem matemática para o crescimento e consumo de substrato

O crescimento e o consumo de substrato do processo fermentativo foram acompanhados por 168 h. Assim, por meio dos dados experimentais, foram avaliados quais modelos de crescimento e consumo de substrato seriam os mais adequados para prever o comportamento do processo.

A Tabela 25 apresenta os valores dos parâmetros dos modelos estudados para avaliar e prever o crescimento e o consumo de substrato pela levedura *P. rhodozyma*. Como mostrado, os valores obtidos para as constantes oriundas das equações de crescimento, para uma mesma equação de substrato, são iguais e/ou bem próximos, exceto pela equação de Contois, que apresenta um valor diferente das demais.

Tabela 25 - Parâmetros estimados para cada modelo estudado.

Equações		Parâmetros			
Crescimento	Substrato	K_s	K_x	K_t	m
Monod	Pirt	2,4660	-	-	$2,3595 \times 10^{-14}$
Contois	Pirt	0,6741	-	-	$2,2204 \times 10^{-16}$
Andrews	Pirt	2,4660	-	$4,4883 \times 10^6$	$2,3595 \times 10^{-14}$
Hiss	Pirt	2,4660	-	$1,6212 \times 10^7$	$2,3595 \times 10^{-14}$
Monod	Modelo Proposto	3,1484	0,0587	-	$2,3595 \times 10^{-14}$
Contois	Modelo Proposto	0,7063	0,3547	-	$2,5707 \times 10^{-14}$
Andrews	Modelo Proposto	3,1489	0,0589	$1,0471 \times 10^8$	$2,3704 \times 10^{-14}$
Hiss	Modelo Proposto	3,1464	0,0578	$9,0729 \times 10^7$	$2,4180 \times 10^{-14}$

A proximidade ou igualdade dos valores das constantes de K_s para ambos os sistemas de estudo (equação de crescimento com concomitante consumo de substrato), deve-se ao fato de que esta constante é diretamente relacionada com o substrato e depende unicamente da

natureza do substrato utilizado. Por se tratar de uma mesma condição experimental, ou seja, com o mesmo substrato para todas as estimações, o parâmetro da constante de saturação deve ser o mesmo independente da equação utilizada para o sistema. Visto que não há nenhuma modificação no meio para ambas as equações de crescimento, tratando-se do mesmo parâmetro, era esperado que os parâmetros estimados fossem iguais ou bem próximos.

A equação de Contois é a única equação cujo valor de K_s é significativamente menor que o valor das demais equações. Isso ocorre porque a estrutura desta equação é diferente das demais, que são uma forma parametrizada da equação de Monod. Na equação de Contois, a constante de saturação é multiplicada pelo crescimento microbiano, o que, matematicamente, acarreta em um valor diferente para o sistema.

Os valores obtidos para K_s e K_x indicam como será a fase exponencial do experimento, pois, quanto menores os valores de K_s e K_x , maior o crescimento de microrganismos e o consumo de substrato e, conseqüentemente, maior será a inclinação das curvas devido à relação numerador/denominador. Dessa maneira, pode-se afirmar que a fase exponencial da curva em estudo denota uma inclinação mediana, já que os valores dos parâmetros não são pequenos o suficiente para mostrar uma elevada inclinação, o que é ratificado pelos dados experimentais. Na equação de Contois, embora o valor de K_s seja menor que os demais, a fase exponencial permanece mediana, pois o parâmetro mencionado é multiplicado pelo crescimento do microrganismo, fazendo com que a razão $(\frac{S}{(K_s \times X) + S})$ seja um valor mediano.

Para ambos os modelos do consumo de substrato, percebe-se que a constante de manutenção celular apresenta um valor pequeno quando comparado aos outros termos da equação, na ordem de 10^{-14} e 10^{-16} , o que torna mínima sua contribuição ao sistema, podendo ser desconsiderado para cálculos matemáticos, a fim de aumentar os graus de liberdade do sistema. A fração do substrato responsável pela manutenção celular é ínfima, quando comparado à fração destinada para gerar novos microrganismos, o que torna o valor pequeno. Por ser um parâmetro diretamente relacionado ao microrganismo, a manutenção celular tende a apresentar o mesmo valor ou um valor aproximado para ambos os modelos utilizados.

Pelos valores de K_I , pode-se concluir que a inibição pelo substrato é praticamente inexistente. Uma vez que, o valor de K_I é dado na ordem 10^7 , para que seu valor seja sempre superior ao valor da concentração de substrato na equação, para tornar o termo $(\frac{S^2}{K_I})$ da equação de Andrews um valor muito pequeno e, a razão $(\frac{K_I}{K_I + S})$ da equação de Hiss próximo de 1, de modo a não afetar significativamente os valores de μ .

O parâmetro K_x oriundo do modelo da equação de substrato (Equação 52), para os modelos de Monod, Andrews e Hiss, apresentam o mesmo valor. Por se tratar do mesmo microrganismo e das mesmas condições de cultivo, a interação microrganismo/substrato deve permanecer a mesma independente do modelo utilizado, visto que este parâmetro depende unicamente da natureza do microrganismo e do substrato utilizados. Para Contois, assim como na equação de crescimento, há uma multiplicação do crescimento microbiano (X) pelo K_s e, como há uma co-dependência entre as equações de crescimento e substrato, o K_x é afetado, fazendo com que o valor deste parâmetro tenda a ser maior que o valor obtido pelas demais equações e pelo presente estudo.

No modelo proposto por Contois, a constante de saturação é diretamente proporcional ao crescimento celular e, ocasionalmente, a taxa de crescimento específica torna-se inversamente proporcional ao crescimento (SAKTHISELVAN; MEENAMBIGA; MADHUMATHI, 2019). Isso faz com que tal modelo apresente maior poder de predição para o experimento, conforme mostra análise estatística apresentada na Tabela 26.

A melhor equação para consumo de substrato, ou seja, aquela que proporciona maior capacidade de predição é dada pelo Modelo Proposto (Equação 52), a qual faz a consideração da interação entre o microrganismo e o substrato. Isso ocorre porque o consumo de substrato da levedura em estudo ocorre rapidamente, demonstrando um efeito de interação intensa entre microrganismo e substrato, que necessita ser computada no modelo para uma maior e melhor representatividade dos dados experimentais.

As equações de Monod, Andrews e Hiss, para uma mesma equação de consumo de substrato, apresentam o mesmo valor para as análises estatísticas. Como a inibição do substrato não ocorre, as equações de Hiss e Andrews, retornam para o modelo de Monod, fazendo com que seus parâmetros K_s e K_x sejam iguais e, conseqüentemente, os parâmetros estatísticos também.

A etapa subsequente à estimação dos parâmetros e análise estatística foi a validação do método por meio dos dados experimentais oriundos do experimento 2. Os dados estatísticos da validação do modelo com os parâmetros estimados são apresentados pela Tabela 27. Para a validação, apenas o melhor modelo de crescimento para cada equação de substrato foi utilizado.

Tabela 26 - Avaliação estatística de cada equação proposta no modelo projetado para prever o crescimento e consumo de substrato da levedura *P. rhodozyma*.

Equação		Parâmetros estatísticos		
Crescimento	Substrato	R^2	SSE	AIC
Monod	Pirt	0,9102	403,8590	134,8883
Contois	Pirt	0,9264	317,1031	115,0575
Andrews	Pirt	0,9102	403,8592	137,0442
Hiss	Pirt	0,9102	403,8590	137,0441
Monod	Modelo Proposto	0,9544	133,6004	46,3347
Contois	Modelo Proposto	0,9725	74,4937	-1,5647
Andrews	Modelo Proposto	0,9543	133,6013	48,5470
Hiss	Modelo Proposto	0,9544	133,6024	48,5477

Os resultados mostrados pela Tabela 27, assim como nas Figuras 28 e 29, corroboram que o Modelo Proposto (Equação 52) é o modelo que apresenta maior capacidade de predição do processo, pois apresenta os melhores resultados estatísticos.

Tabela 27 - Avaliação estatística da validação dos melhores modelos para predição do crescimento e consumo de substrato da levedura *P. rhodozyma*.

Equação		Parâmetros		
Crescimento	Substrato	R^2	SSE	AIC
Contois	Pirt	0,9281	356,7874	124,7264
Contois	Modelo Proposto	0,9714	78,1212	2,3341

Os resultados estatísticos, bem como as Figuras 28 e 29, deixam claro que a levedura *P. rhodozyma* nas condições em estudo, tem seu cultivo diretamente afetado pela densidade celular e apresenta uma grande interação com o substrato utilizado para cultivá-la. Visto que os melhores resultados para a predição de seu crescimento e consumo de substrato foram obtidos pelos modelos de Contois e pelo Modelo Proposto (Equação 52).

Figura 28 - Comparação entre os dados experimentais do crescimento da levedura *P. rhodozyma* e o modelo de crescimento determinado pela equação de Contois em combinação com as equações de consumo de substrato de Pirt e o modelo proposto.

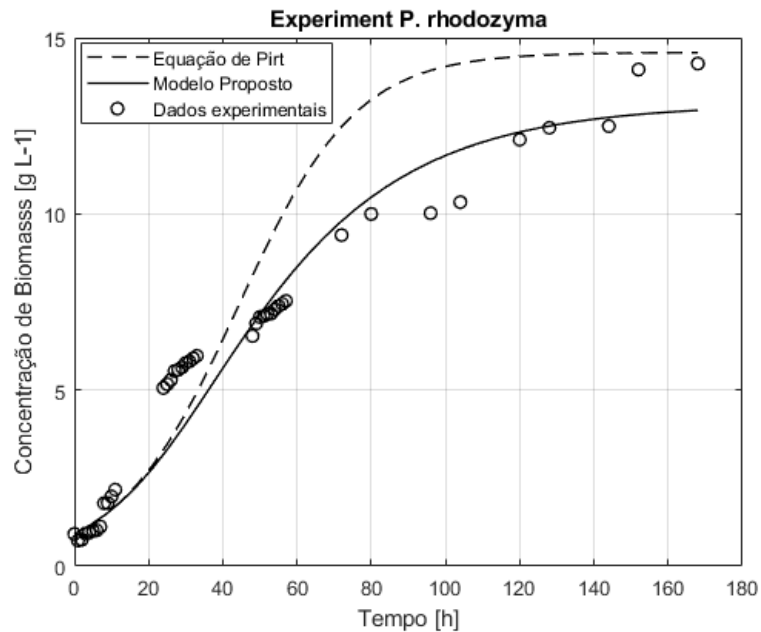
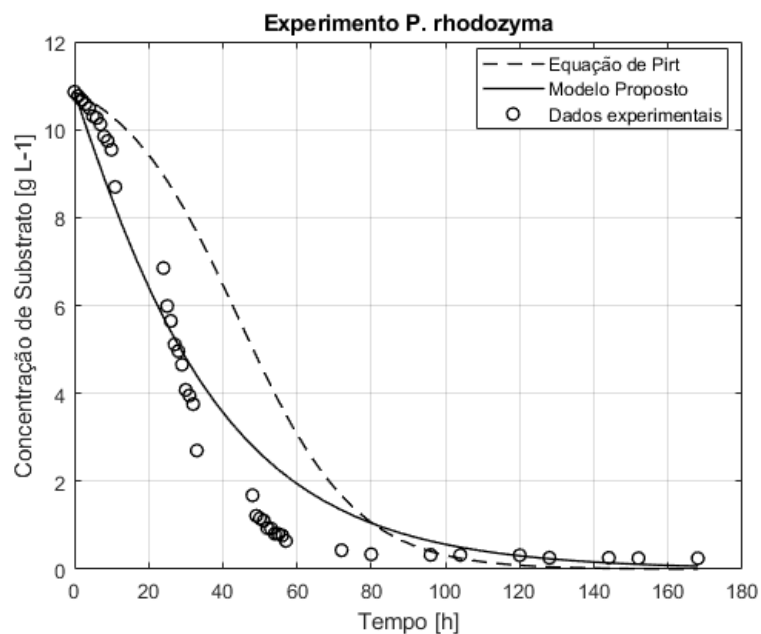


Figura 29 - Comparação entre os dados experimentais do consumo de substrato da levedura *P. rhodozyma* e os modelos de consumo de substrato de Pirt e o modelo proposto, utilizando-se a equação de Contois para o modelo de crescimento.



4.4.3. Modelagem matemática para a obtenção do produto

Para a determinação do modelo para cinética do produto, as equações da Tabela 28 foram utilizadas. As equações de crescimento e consumo de substrato aqui utilizadas, foram as equações que apresentaram os melhores ajustes na etapa anterior (4.4.2.). Escolheu-se uma combinação de equação de crescimento, consumo de substrato e obtenção de produto por vez. Vale ressaltar, que apenas os parâmetros α , β e P_m foram estimados. Os parâmetros da curva de crescimento, assim como os do consumo de substrato foram estimados anteriormente e como trata-se das mesmas curvas fermentativas, estes não se alteraram.

Diferentemente do crescimento e do consumo de substrato do processo fermentativo, a cinética do produto foi acompanhada uma única vez ao dia, sendo determinada 7 vezes ao longo das 168 h de processo. A escolha de apenas 7 pontos experimentais ocorreu devido à quantidade de biomassa exigida para a determinação dos carotenoides e não era possível obter a quantidade necessária em questão de horas.

Tabela 28 - Equações utilizadas para a determinação do produto.

	Equação	Referência
Crescimento		
Contois (1959)	$\frac{dX}{dt} = \left(\mu_{max} \times \left(\frac{S}{(K_s \times X) + S} \right) \right) \times X$	(Contois, 1959)
Consumo de substrato		
Pirt (1965)	$\frac{dS}{dt} = - \left(\left(\left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} \right) + m \right) \times X \right)$	(Pirt, 1965)
Modelo Proposto	$\frac{dS}{dt} = \left(\left(\mu_{max,s} \times \left(\frac{X}{K_x + X} \right) \right) \times S \right) + m$	(Estudo de caso 3)
Obtenção de produto		
Luedeking e Piret (1959)	$\frac{dP}{dt} = (\alpha X + \beta) \times X$	(Luedeking et al., 1959)
Ghose e Tyagi (1979)	$\frac{dP}{dt} = \left(\mu_x \times \left(1 - \frac{P}{P_m} \right) \right) \times X$	(Ghose; Tyagi, 1979)

Assim, por meio dos dados experimentais, testou-se quais modelos de obtenção de produto, associado às equações de crescimento e consumo de substrato seriam os mais aptos para prever o comportamento do processo.

A Tabela 29 apresenta os valores dos parâmetros dos modelos estudados para avaliar e prever o crescimento, consumo de substrato e obtenção de produto pela levedura *P. rhodozyma*.

Os parâmetros para a equação de Ghose e Tyagi, (1979) apresentam valores para a concentração do produto quando não há mais crescimento celular (P_m), o que dificilmente poderia ser obtido experimentalmente. Tal valor de parâmetro ressalta a inadequação deste modelo para prever a obtenção de carotenoides pela levedura *P. rhodozyma*. Os valores obtidos para os parâmetros de Luedeking e Piret (1959) para os dois modelos de equação de consumo de substrato apresentam magnitudes próximas e valores condizentes ao processo fermentativo. O valor do parâmetro α necessita ser pequeno, uma vez que este é multiplicado pelo quadrado da concentração de biomassa (X^2). Para β , por ser somado ao valor de α emultiplicado pelo crescimento, seu valor não poderia ser elevado.

Tabela 29 - Parâmetros utilizados e os estimados para cada modelo estudado.

Parâmetros	Equações			
	Contois + Pirt		Contois + Modelo Proposto	
	Luedeking e Piret (1959)	Ghose e Tyagi (1979)	Luedeking e Piret (1959)	Ghose e Tyagi (1979)
K_s	0,6741	0,6741	0,7063	0,7063
K_x	-	-	0,3547	0,3547
m	$2,2204 \times 10^{-16}$	$2,2204 \times 10^{-16}$	$2,5707 \times 10^{-14}$	$2,5707 \times 10^{-14}$
α	0,0221	-	0,0180	-
β	$2,8140 \times 10^{-13}$	-	0,0013	-
P_m	-	$2,3798 \times 10^8$	-	$9,8217 \times 10^7$

A análise estatística é apresentada na Tabela 30, demonstrando que para ambos os modelos da cinética de obtenção do produto, o modelo mais representativo e com maior poder de predição do experimento é dado pela equação por Luedeking e Piret (1959). O modelo proposto por esses autores é para produtos diretamente associados ao crescimento e os carotenoides obtidos pela *P. rhodozyma* são diretamente associados ao crescimento, já que se

trata de um produto intracelular. Por outro lado, a equação de Ghose e Tyagi, (1979) é mais indicada para cinética de produto, quando há provável inibição por geração de metabólitos, o que de fato não ocorreu com este microrganismo. Os pigmentos produzidos não apresentam risco e nem toxicidade ao microrganismo, de modo que, não haveria tendência a inibir seu crescimento.

Tabela 30 - Análise estatística para os modelos de predição de obtenção de carotenoides totais.

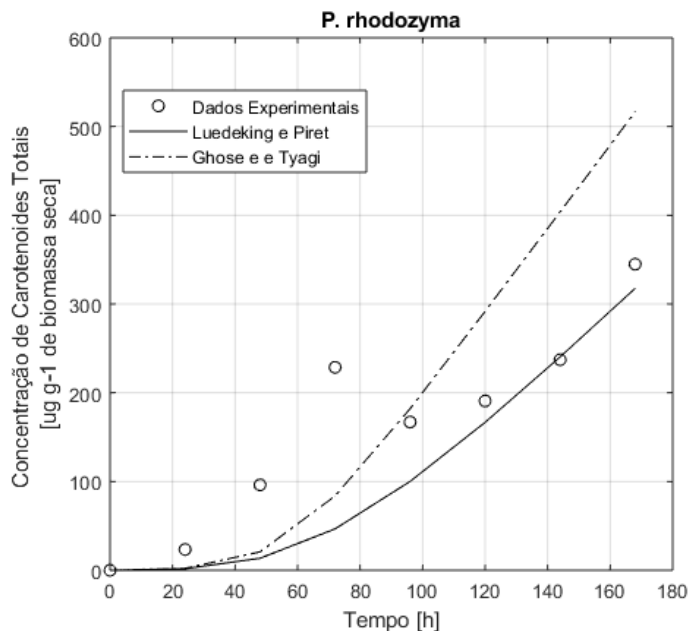
Parâmetros	Equações			
	Contois + Pirt		Contois + Modelo Proposto	
	Luedeking e Piret (1959)	Ghose e Tyagi (1979)	Luedeking e Piret (1959)	Ghose e Tyagi (1979)
R^2	0,8704	0,5304	0,9038	0,5069
SSE	56509	246950	41985	250520
AIC	190,9099	223,9152	183,7795	224,2595

A validação do modelo, conforme a Tabela 31, ratifica que o modelo mais adequado para a predição do produto é dado pela combinação das equações de Contois, Modelo Proposto e da equação de Luedeking e Piret (1959). Tal combinação é a melhor escolha de predição para o processo fermentativo em estudo. A Figura 30 demonstra a melhor predição para o modelo de produto associado ao crescimento, conforme descrito por Luedeking e Piret (1959).

Tabela 31 - Análise estatística da validação dos melhores modelos estudados.

Parâmetros	Equações	
	Contois + Luedeking e Piret	
	Pirt	Modelo proposto
R^2	0,9055	0,9091
AIC	198,7696	181,5222

Figura 30 - Comparação entre os dados experimentais da obtenção de produtos pela levedura *P. rhodozyma* e os modelos de Luedeking e Piret e Ghose e Tyagi.



O modelo proposto para o consumo de substrato proporcionou um melhor ajuste para predição do produto quando comparado ao modelo de Pirt, ressaltando que, a melhor combinação para prever o processo fermentativo como um todo é utilizando a equação de Contois para o crescimento, o modelo de consumo de substrato proposto no estudo de caso 3 e a equação de Luedeking e Piret para o produto. Entretanto, um estudo mais aprofundado, contabilizando também a influência do erro experimental, é necessário para aumentar a capacidade de predição do modelo para a concentração de produto.

5. CONCLUSÃO

A modelagem de processos fermentativos como forma de melhorar e auxiliar tais processos é pouco reconhecida e explorada. Sabe-se que o crescimento e o metabolismo dos microrganismos são diretamente dependentes das condições de cultivo. Por isso, identificar como tais condições afetam o sistema é de extrema importância para uma melhor compreensão do processo. Dessa maneira, o presente estudo avaliou a influência de fatores externos, como a iluminância e a aplicação de campos magnéticos em cultivos de microalga e, aplicação de campo magnético em cultivo de levedura, além de avaliar a interação de microrganismo e substrato a fim de contabilizar esses efeitos na cinética microbiana, propondo então novos modelos matemáticos.

No estudo de caso 1, o modelo proposto que leva em consideração a influência da iluminância e do campo magnético, mostrou-se capaz de descrever e prever melhor o crescimento da microalga *Spirulina*, diferentemente do modelo de Verhulst, normalmente sugerido pela literatura. Demonstrando-se, então, que fatores externos influenciam o crescimento microbiano e que, portanto, novos modelos precisam ser estudados a fim de se aproximarem ao que de fato ocorre no interior do microrganismo.

O uso de redes neurais artificiais como forma de prever o comportamento do processo fermentativo torna-se atrativo por demonstrar habilidade de prever o processo de maneira geral, visto que possui a capacidade de avaliar os parâmetros que influenciam como um todo. No estudo de caso 2, a aplicação de redes neurais para prever o processo fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* mediante aplicação de campo magnético, aeração e agitação possibilitou a predição do modelo considerando-se todas as variáveis de entrada para convergir nas variáveis de saída: biomassa, concentração de substrato, pH e glutadiona. Diferentemente dos modelos cinéticos existentes, as redes conseguiram estimar o processo levando em consideração todos os fatores externos, apresentando elevado poder de predição.

A interação microrganismo/substrato apresenta considerável importância ao processo, visto que o modelo tradicional apresentado na literatura, o modelo de Pirt, não foi capaz de prever com acurácia os processos fermentativos em estudo. O presente estudo mostrou que, para uma alta taxa inicial de consumo de substrato, o modelo de Pirt reduz sua capacidade de predição, o que não acontece com o modelo proposto pelo estudo de caso 3. O modelo proposto pelo estudo de caso 3, mostrou-se eficaz para a predição de consumo de substratos utilizando-

se leveduras em fermentações submersas e apresentou-se como o mais indicado para tal previsão ao ser comparado ao modelo de Pirt.

O estudo de caso 4 demonstrou que microrganismos predispostos à produção de um determinado produto, podem ter sua rota metabólica alterada quando expostos a uma situação de estresse. Novas técnicas de extração de pigmentos tornam-se necessárias para que a rota biotecnológica seja viável, de modo que o processo utilizado apresente segurança para o produto final e seja isento de produtos tóxicos. Para a predição de obtenção de produtos diretamente associados ao crescimento, a equação de Luedeking e Piret apresenta-se como a equação mais próxima do processo fermentativo, embora estudos mais aprofundados sejam necessários para aumentar a capacidade de predição deste modelo para os produtos.

De modo geral, os novos modelos propostos mostraram-se promissores, tanto para prever o crescimento de microrganismo mediante exposição a campo magnético, quanto para prever o consumo de substrato levando-se em consideração a interação entre o microrganismo e o substrato. Em relação aos modelos para a obtenção de produtos fermentativos, há a necessidade de realização de trabalhos futuros para aumentar a sua capacidade preditiva.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. J. Fungal Cell Wall Chitinases and Glucanases. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2029 – 2035, 2004.
- AFFAM, A. C.; CHUNG, W. C.; SWEE, W. C. Can induced magnetic field enhance bioprocesses? – Review. **MATEC Web of Conferences**. 203 03007, 2018.
- AIBA, S. Growth Kinetics of Photosynthetic Microorganisms. **In: Microbial Reactions. Advances in Biochemical Engineering**, vol 23. Springer, Berlin, Heidelberg, 1982.
- AKAIKE, H. A new look at the statistical model identification. **IEEE Transactions on Automatic Control**, v. 19, p. 716 – 723, 1974.
- AL-DHABI, N. A.; ARASU, M. V. Quantification of Phytochemicals from Commercial *Spirulina* Products and Their Antioxidant Activities. **Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1 – 13, 2016.
- AN, G. H.; JOHNSON, E. A. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.57, p. 191 – 203, 1990.
- ANDRADE, M. R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 32, n. 5, p. 1551 – 1556, 2008.
- ANDREWS, A. G.; PHAFF, H. J.; STARR, M. P. Carotenoids of *Phaffia rhodozyma*, A Red-Pigmented Fermenting Yeast. **Photochemistry**, v. 15, p. 1003 – 1007, 1976.
- ANDREWS, J. F. A Mathematical Model for the Continuous Culture of Microorganisms Utilizing Inhibitory Substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. X, p. 707 – 723, 1968.
- ASUERO, A. G.; SAYAGO, A.; GONZÁLEZ, A. G. The correlation coefficient: An overview. **Crit. Rev. Anal. Chem**, v. 36, p. 41 – 59, 2006.
- BAILEY, J. E. Mathematical Modeling and Analysis in Biochemical Engineering: Past Accomplishments and Future Opportunities. **Biotechnology Progress**, v. 14, p. 8 – 20, 1998.
- BAMFORTH, C. W. The science underpinning food fermentations. In.: **Food, Fermentation and Micro-organisms**. 1 ed. Iowa: Blackwell Science, p. 1 – 39, 2005.
- BANNISTER, T. T. Quantitative Description of Steady State, Nutrient-Saturated Algal Growth, Including Adaptation. **Limnology and Oceanography**, v. 24, p. 76 – 96, 1979.
- BARNES, F. S. Mechanisms for Electric and Magnetic Fields Effects on Biological Cells. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 41, p. 4219 – 4224, 2005.
- BARNOTHY, J. M. Introduction. In: **Biological Effects of Magnetic Fields**. 1 ed. New York: Springer Science + Business Media, LLC, p. 3 – 24, 1964.

- BATGHARE, A. H.; SINGH, N.; MOHOLKAR, V. S. Investigations in Ultrasound–Induced Enhancement of Astaxanthin Production by Wild Strain *Phaffia rhodozyma* MTCC 7536. **Bioresource Technology**, v. 254, p. 166 – 173, 2018.
- BAY, J. et al. Modeling of enhanced VFAs production from waste activated sludge by modified ADM1 with improved particle swarm optimization for parameters estimation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 103, p. 22 – 31, 2015.
- BERRY, D. R.; BROWN, C. Physiology of yeast growth. In: **Yeast Biotechnology**. 1 ed. London: Springer Netherlands, p. 159 – 199, 1987.
- BHARGAV, S. et al. Solid-state Fermentation: An Overview. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly**, v. 22, n. 1, p. 49 – 70, 2008.
- BINHI, V. N.; SAVIN, A. V. Effects of Weak Magnetic Fields on Biological Systems: Physical Aspects. **Physics – Uspekhi**, v. 46, p. 259 – 291, 2003.
- BOGSAN, C. S.; NERO, L. A.; TODOROV, S. D. Traditional Knowledge to an Innovative Approach for Bio-preservation in Food by Using Lactic Acid Bacteria. In: **Beneficial Microorganisms in Food and Nutraceuticals**. New York: Springer, p. 1 – 36, 2015.
- BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In.: **Biociencia Industrial: Engenharia Bioquímica**. V.2. Editora Edgard Blücher, p. 123 – 178, 2001.
- BONYADI, M. R.; MICHALEWICZ, Z. Particle Swarm Optimization for Single Objective Continuous Space Problems: A Review. **Evolutionary Computation**, v. 25, p. 1 – 54, 2017.
- BOZDOGAN, H. Akaike’s information criterion and recent developments in information complexity. **J. Math. Psychol.**, v. 44, p. 62 – 91, 2000.
- BRANDUARDI, P. et al. Introduction. In.: **Yeast: Molecular and Cell Biology**. Wiley-VCH, p. 1 – 4, 2012
- BRENNAN, L.; OWENDE, P. Biofuels from Microalgae – A Review of Technologies for Production, Processing, and Extractions of Biofuels and Co-Products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, n. 2, p. 557 – 577, 2010.
- BRUSLIN, L. Environmental factors. In: **Microbiology**. Open Oregon State, p. 68 – 71, 2017.
- BURDEN, F.; WINKLER, D. Bayesian regularization of neural networks. In.: **Artificial Neural Networks – Methods and applications**. Humana Press: p. 25 – 44, 2008.
- BUZZINI, P.; VAUGHAN-MARTINI, A. Yeast biodiversity and biotechnology. In: **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 533 – 560, 2006.
- CALVO, M.; MONTIJANO, J. I.; RANDEZ, L. A Fifth-Order Interpolant for the Dormand and Prince Runge-Kutta Method. **Journal of Computational and Applied Mathematics**, v. 29, p. 91 – 100, 1990.

- CARDOSO, L. A. C. et al. Biotechnological production of carotenoids and their applications in food and pharmaceutical products. In.: **Carotenoids**, p. 125 – 141, 2017.
- CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. The fungi was a major group of organisms. In.: **The Fungi**. 2 ed. Academic Press, p. 1 – 10, 2001.
- CHAPRA, S. C.; CANALE, R. P. Modelagem, Computadores e Análises de Erros. In.: **Métodos Numéricos para Engenharia**. São Paulo: Mc Graw Hill, 2008.
- CHEN, L. Z.; NGUANG, S. K.; CHEN, X. D. Introduction. In: **Modelling Optimization of Biotechnological Process: Artificial Intelligence Approaches**. Berlin: Springer, p. 1 – 16, 2006.
- CHEN, H. Introduction. In.: **Modern Solid State Fermentation: Theory and Practice**. New York: Springer Science + Business Media Dordrecht, p. 1 – 23, 2013.
- CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 294 – 306, 2007.
- CLERC, M. What is a difficult problem? In.: **Particle swarm optimization**. ISTE, pp 21 – 28, 2006.
- COCKSHOT, A. R.; HARTMAN, B. E. Improving the fermentation medium for *Echinocandin B* production part II: Particle swarm optimization. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 661 – 669, 2001.
- COLEMAN, T. F.; LI, Y. An Interior, Trust Region Approach for Nonlinear Minimization Subject to Bounds. **Society for Industrial and Applied Mathematics. Journal Optimization**, v. 6, p. 418 – 445, 1996.
- CONTOIS, D. E. Kinetics of Bacterial Growth: Relationship Between Population Density and Specific Growth Rate of Continuous Cultures. **Journal of General Microbiology**, v. 21, p. 40 – 50, 1959.
- COWAN, M. K.; TALARO, K. P. Prokaryotic profiles: the bacteria and archaea. In.: **Microbiology: A Systems Approach**. New York: Mc Graw Hill, p. 89 – 118, 2006.
- CZERWONKA, A. et al. Anticancer effect of the water extract of a commercial *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) product on the human lung cancer A549 cell line. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 292 – 302, 2018.
- DACH, J. et al. The use of Neural Modelling to Estimate the Methane Production from Slurry Fermentation Processes. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 56, p. 603 – 610, 2016.
- DAVIS, M. E. Initial – Value Problems for Ordinary Differential Equations. Initial- values problems for ordinary equations. In.: **Numerical Methods and Modeling for Chemical Engineers**. New York: Wiley, p. 1 – 52, 1984.

DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v., p. 5062 – 5072, 2007.

DEAMICI, K. M. et al. Static magnetic fields in culture of *Chlorella fusca*: Bioeffects on growth and biomass composition. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 912 – 916, 2016.

DEGASPERI, A.; FEY, D.; KHOLODENKO, B.N. Performance of Objective Functions and Optimisation Procedures for Parameter Estimation in System Biology Models. **Systems Biology Applications**, v. 20, p. 1 – 9, 2017.

DINI, L.; ABBRO, L. Bioeffects of Moderate-Intensity Static Magnetic Fields on Cells Culture. **Micron – Journal**, v. 35, p. 195 – 217, 2005.

DORMAND, J. R.; PRINCE, P. J. A family of Embedded Runge – Kutta Formulae. **Journal of Computational and Applied Mathematics**, v. 6, p. 19 – 26, 1980.

DOWNS, D. M. Understanding Microbial Metabolism. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 533 – 559, 2006.

DUTTA, J. R.; DUTTA, P. K.; BANERJEE, R. Optimization of culture parameters for extracellular protease production from a newly isolated *Pseudomonas* sp. using response surface and artificial neural network models. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2193 – 2198, 2004.

EL-BAKY, H. H. A.; EL-BAROTY, G. S. Optimization of Growth Conditions for Purification and Production of L-Asparaginase by *Spirulina maxima*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1 – 7, 2016.

EL-MANSI, E. M. T. et al. Fermentation microbiology and biotechnology: an historical perspective. In: **Fermentation Microbiology and Biotechnology**. 3 ed. New York: CRC Press, p. 1 – 8, 2012.

ENDERS, F. B. Coefficient of determination. Enciclopedia Britannica (2017). <http://www.britannica.com/science/coefficient-of-determination> [Acesso 14 Outubro 2018].

FELDMANN, H. **Yeast: Molecular Cell and Biology**. 2 ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, 2012.

FENCL, Z. Theoretical Analysis of Continuous Culture Systems. In.: **Theoretical and Methodological Basis of Continuous Culture of Microorganisms**. Academic Press: Nova York, p. 69 – 156, 1966.

FIJALKOWSKI, K. et al. Modification of Bacterial Cellulose Through Exposure to the Rotating Magnetic Field. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 52 – 60, 2015.

FREDRICKSON, A. G.; MEGEE III, R. D.; TSUCHIYA, H. M. Mathematical Models for Fermentation Processes. **Advances in Applied Microbiology**, v. 13, p. 419 – 465, 1970.

FRENGOVA, G. I.; BESHKOVA, D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeast of biotechnological importance. **J. Ind. Microbial. Biotechnol.**, v. 36, p. 163 – 180, 2009.

GAO, S. et al. Inactivation of Microorganisms by Low-Frequency High-Power Ultrasound: 2. A Simple Model for the Inactivation Mechanism. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 21, p. 454 – 460, 2014.

GHAENI, M.; ROOMIANI, L. Review for Application and Medicine Effects of *Spirulina*, *Spirulina Platensis* Microalgae. **Journal of Advanced Agricultural Technologies**, v. 3, n. 2, p. 114 – 117, 2016.

GHOSE, T. K.; TYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. **Biotech. And Bioeng.**, v. 21, p. 1401 – 1420, 1979.

GIRARD, P. et al. β -Carotene producing mutants of *Phaffia rhodozyma*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 41, p. 183 – 191, 1994.

GONZÁLEZ-FIGUEIREDO, C.; FLORES-ESTRELLA, R. A.; ROJAS-REJÓN, O. A. Fermentation: Metabolism, Kinetic Models, and Bioprocessing. In.: **Current Topics in Biochemical Engineering**, p. 1 – 18, 2019.

GOTTSCHALK, G. Bacterial fermentations. **Bacterial Metabolism**. 1 ed. New York: Springer-Verlag, p. 167 – 224, 1979.

GRIMA M. E. et al. n-3 PUFA Productivity in Chemostat Cultures of Microalgae. **Applied of Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 599 – 605, 1993.

GRIMA M. E. et al. A Study on Simultaneous Photolimitation and Photoinhibition in Dense Microalgal Cultures Taking into Account Incident and Average Irradiances. **Journal Biotechnology**, v. 45, p. 59 – 69, 1996.

HABIB, M. A. et al. A Review on Culture, Production and Use of *Spirulina* as Food for Humans and Feeds for Domestic Animals and Fish. **FAO – Fisheries and Aquaculture Circular**, n. 1034, Rome, 2008.

HAGAN, M. T. et al. Neuron model and network architectures. In.: **Neural Network Design**. 2^a Ed. Martin Hagan, p. 2-1 – 2-23, 2014.

HANSOM, J. R. Fungi and the Development of Microbiological Chemistry. In.: **The Chemistry of Fungi**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, p. 1 – 17, 2008.

HIRANO, M.; OHTA, A.; ABE, K. Magnetic field effects on photosynthesis and growth of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 3, p. 313–316, 1998.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In.: **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. V.2. Editora Edgard Blücher, p. 93 – 122, 2001.

- HO, S. H. et al. Combining light strategies with recycled medium to enhance the economic feasibility of phycocyanin production with *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 669 – 675, 2018.
- HUY, N. et al. Studies on optimization of nitrogen sources for astaxanthin production by *Phaffia rhodozyma*. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 8, p. 365 – 370, 2007.
- JOHNSON, E. A. *Phaffia rhodozyma*: colorful odyssey. **International Microbiology**, v. 6, p. 169 – 174, 2003.
- JOHNSON, E. A.; SCHROEDER, W. A. Microbial carotenoids. In.: **Advantages in Microbial Engineering Biotechnology**, v. 53, p. 120 – 178, 1995.
- KALOGIRATOU, Z. et. al. Runge–Kutta Type Methods with Special Properties for the Numerical Integration of Ordinary Differential Equations. **Physics Repots**, v. 536, p. 75 – 146, 2014.
- KATZ, E.; LIOUBASHEVSKI, I.; WILLNER I. Magnetic field effects on bioelectrocatalytic reactions of surface-confined enzyme systems: enhance performance of biofuel cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, p. 3979 – 3988, 2005.
- KENNEDY, J.; EBERHART, R. Particle Swarm Optimization. **Proceedings of the IEEE International Conference on Neural Networks**, v. 4, p. 1942 – 1948, 1995.
- KOUTINAS, M. et al. Bioprocess Systems Engineering: Transferring Traditional Process Engineering Principles to Industrial Biotechnology. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 3, p. 1 – 9, 2012.
- KUSDIYANTINI, E. et al. Growth Kinetics and Astaxanthin Production of *Phaffia rhodozyma* on Glycerol as a Carbon Source During Batch Fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 20, p. 929 – 934, 1998.
- KVALSETH, T. O. Cautionary note about R^2 . **Am. Stat.**, v. 39, p. 279 – 285, 1985.
- LANE, T. P.; DUMOUCHEL, W. H. Simultaneous Confidence Intervals in Multiple Regression. **The American Statistician**, v. 48, p. 315 – 321, 1994.
- LARSDOTTER, K. Wastewater treatment with microalgae – a literature review. **Vatten**, v. 62, p. 31 – 38, 2006.
- LEE, K. Y.; CHUNG, N.; HWANG, S. Application of an Artificial Neural Network (ANN) Model for Predicting Mosquito Abundances in Urban Areas. **Ecological Informatics**, v. 36, p. 172 – 180, 2016.
- LEE, C. S. et al. Effects of Photoperiod on Nutrient Removal, Biomass Production, and Algal-Bacterial Population Dynamics in Lab-Scale Photobioreactors Treating Municipal Wastewater. **Water Research**, v. 68, p. 680 – 691, 2015.
- LEVASSEUR, W. et al. Impact of Seconds to Minutes Photoperiods on *Chlorella vulgaris* Growth Rate and Chlorophyll *a* and *b* Content. **Algae Research**, v. 36, p. 10 – 16, 2018.

LI, Z; GUO, S; LI, L; CAI, M. Effects of electromagnetic field on the batch cultivation and nutritional composition of *Spirulina platensis* in an air-lift photobioreactor. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 700-705, 2007.

Li WW et al., Impact of static magnetic field on the electricity production of *Shewanella* – inoculated microbial fuel cells. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 26, p. 3987 – 3992, 2011.

LI, X. et al. Effect of Nitrogen Limitation on Biochemical Composition and Photosynthetic Performance for Fed-Batch Mixotrophic Cultivation of Microalgae *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 263, p. 555 – 561, 2018.

LIU, Y. S.; WU, J. Y.; HO, K. P. Characterization of Oxygen Transfer Conditions and Their R. Effects on *Phaffia rhodozyma* Growth and Carotenoid Production in Shake-Flask Cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 331 – 335, 2006.

LIU, S. et al. History and Development of Solid-State Fermentation. In.: **Solid State Fermentation for Foods and Beverages**. New York: CRC Press, p. 1 – 30, 2014.

LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation. Batch Process at Controlled pH. **Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering**, v. 1, p. 393 – 412, 1959.

LUZI, G. et al. Comparison Between Different Strategies for the Realization of Flashing-Light Effects – Pneumatic Mixing and Flashing Illumination. **Algal Research**, v. 38, p. 1 – 12, 2019.

MADIGAN, M. T. et al. Fungos. In.: **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 555 – 561, 2016.

MAHANTA, D. J.; BORAH, M.; SAIKIA, P. A Study of Kinect Models for Analyzing the Bacteria Growth Rate. **American International Journal of Research in Science, Technology, Engineering & Mathematics**, v. 8, n° 1, p. 68 – 72, 2014.

MAIWALD, T.; TIMMER, J. Dynamical Modeling and Multi-Experiment Fitting with PottersWheel. **Bioinformatics**, v. 24, p. 2037 – 2043, 2008.

MARINI, F.; WALCZAK B. Particle swarm optimization (PSO). A tutorial. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 149, p. 153 – 165, 2015.

MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Microalgal and Cyanobacterial cultivation: The supply of nutrients. **Water Research**, v. 65, p. 186 – 202, 2014.

MASSOUD, R.; KHOSRAVI-DARANI, K. A Review on the Impacts of Process Variables on Microbial Production of Carotenoid Pigments. In.: **Food Biosynthesis**. Academic Press: 2017.

MATA-ALVAREZ, J.; MICHEL, D. A. Mathematical Modeling in Biotechnology. In: **Biotechnology – Vol. II**. Encyclopedia of Life Support Systems, p. 1 – 8, 2009.

MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for Biodiesel Production and Other Applications: A Review. **Renewable and Sustainable Reviews**, v. 14, p. 217 – 232, 2010.

MEIER, L. et al. Photosynthetic Biogas Upgrading Using Microalgae: Effect of light/dark Photoperiod. **Renewable Energy**, v. 106, p. 17 – 23, 2017.

MEIJARD, J. P. Efficient Numerical Integration of the Equations of Motion of Non-Smooth Mechanical Systems. **ZAAM Journal of Applied Mathematics and Mechanics**, v. 77, p. 419 – 427, 1997.

MEZURA-MONTES, E.; COELLO, C. A. C. Constraint-handling in nature-inspired numerical optimization: Past, present and future. *Swarm and Evolutionary Computation*, p. 173 – 194, 2011.

MEZZOMO, N.; FERREIRA, S. R. Review article – Carotenoids functionality, sources, and processing by supercritical technology – a review. **Hindawi Publishing Corporation Journal of Chemistry**, v. 2016, p. 1 – 16, 2016.

MICHELLON, M. et al. Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: a comparison between different techniques of cell disruption. **Food Sci. Biotechnol.**, v. 21, p. 1 – 8, 2012.

MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426 – 428, 1959.

MILLER, M. W.; YONEYAMA, M.; SONEDA, M. *Phaffia*, A New Yeast Genus in the *Deuteromycotina* (*Blastomycetes*). **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 26, n. 2, p. 286 – 291, 1976.

MITCHELL, D. A.; BEROVIC, M.; KRIEGER, N. Solid-State Fermentation Bioreactor Fundamentals: Introduction and Overview. In: **Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation**. New York: Springer, p. 1 – 12, 2006.

MOAT, A. G.; FOSTER, J. W.; SPECTOR, M. P. Fermentation pathways. In: **Microbial Physiology**. 4 ed. New York: Wiley-Liss, p. 412 – 433, 2002.

MONOD, J. The Growth of Bacterial Cultures. **Annual Review of Microbiology**, v. 3, p. 371 – 394, 1949.

MONTES DE OCA, R. et al. Yeast description and structure. In: **Yeast Additive and Animal Production**. Índia: PubBioMed, p. 4 – 13, 2016.

MOORE, R. L. Biological Effects of Magnetic Fields: Studies with Microorganisms. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 25, p. 1145 – 1151, 1979.

MORAIS, M. G. et al. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* Strain. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 32, p. 1879 – 1880, 2008.

MORÉ, J. J.; SORENSEN, D. C. Computing a Trust Region Step. **Society for Industrial and Applied Mathematics. Journal Scientific and Statistical Computing**, v. 3, p. 553 – 572, 1983.

MOULTON, G. G. Introduction to fermentation. In.: **Fed-Batch Fermentation: A Practical Guide to Scalable Recombination Protein Production in Escherichia Coli**. Amsterdam: Elsevier, 1 – 30, 2014.

NAJAFPOUR, G. D. Industrial Microbiology. In.: **Biochemical Engineering and Biotechnology**. 1 ed. Amsterdam: Elsevier, p. 1 – 13, 2007.

NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; LIDÉN, G. From cellular function to industrial products. In.: **Bioreaction Engineering Principles**. 2 ed. New York: Springer Berlin Heidelberg, p. 9 - 46, 2003.

NUANPENG, S. et al. Ethanol Production from Sweet Sorghum Juice at High Temperatures Using a Newly Isolated Thermotolerant Yeast *Saccharomyces cerevisiae* DBKKU Y-53. **Energies**, v. 9: 253, 2016.

NUGROHO, R. H.; YOSHIKAWA, K.; SHIMIZU, H. Metabolomic analysis of acid stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, p. 1 – 9, 2015.

OJHA, K. S. et al. Ultrasound Technology for Food Fermentation Applications. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p. 410 – 417, 2017.

OLAIZOLA, M. Commercial Development of Microalgal Biotechnology: From the test tube to the marketplace. **Biomolecular Engineering**, v. 20, n. 4 – 6, p. 459 – 466, 2003.

PADILHA, C. E. A. Recuperação e purificação de quitosanas usando adsorção em leito expandido com streamline deae com modelagem e simulação usando redes neurais. 129 p. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153 – 1169, 2000.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 81 – 84, 2003.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; LARROCHE, C. Introduction. In.: **Current Developments in Solid-State Fermentation**. New Delhi: Springer, p. 3 – 12, 2008.

PATIAS, L. D. et al. Carotenoid profile of three microalgae/cyanobacteria species with peroxy radical scavenger capacity. **Food research international**, v. 100, p. 260 – 266, 2017.

PEDERSEN, M. E. Good parameters for particle swarm optimization. Luxembourg: Hvass Laboratories, p. 1 – 12, 2010.

- PELEG, M.; CORRADINI, M.G. Microbial Growth Curves: What the Models Tell Us and What They Cannot. **Critical Reviews. Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 917 – 945, 2011.
- PÉREZ, E. B.; PINA, I. C.; RODRÍGUEZ, L. P. Kinetic model for growth of *Phaeodactylum tricornutum* in intensive culture photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 520 – 525, 2008.
- PHAFF, H. J. My Life with Yeasts. **Annual Review of Microbiology**, v. 40, p. 1 – 53, 1986a.
- PHAFF, H. J. Ecology of Yeasts with Actual and Potential Value in Biotechnology. **Microbial Ecology**, v. 12, p. 31 – 42, 1986b.
- PHISALAPHONG, M.; SRIRATTANA, N.; TANTHAPANICHAKOON, W. Mathematical Modeling to Investigate Temperature Effect on Kinetic Parameters of Ethanol Fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, p. 36 – 43, 2006.
- PIENKOS, P. T.; DARZINS, A. The Promise and Challenges of Microalgas – Derived Biofuels. **Biofuels Bioproducts & Biorefining**, v. 3, p. 431 – 440, 2009.
- PINTO, J. C.; LAGE, P. L. C. Modelagem matemática para processos de engenharia química. In: **Métodos Numéricos para Engenharia Química**. Rio de Janeiro: E-papers, p. 1 – 27, 2001.
- PIRT, S. J. The Maintenance Energy of Bacteria in Growing Cultures. In: **Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 163, p. 224 – 231, 1965.
- POLI, R.; KENEDY, J.; BLACKWELL, T. Particle Swarm Optimization. **Swarm Intell**, v. 1, p. 33 – 57, 2007.
- PRABHAKAR, A. et al. Review Article: An overview of Engineering Aspects of Solid State Fermentation. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 1, n. 2, p. 10 – 16, 2005.
- PRAJAPATI, J. B.; NAIR, B. M. The history of fermented food. In: **Handbook of Fermented Functional Foods**. 2 ed. New York: CRC Press, p. 1 – 24, 2008.
- PRINCE, P.J.; DORMAND, J. R. High Order Embedded Runge – Kutta Formulae. **Journal of Computational and Applied Mathematics**, v. 7, p. 67 – 75, 1981.
- PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and Industrial Applications of Micro Algae – A Review. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v.3, n. 4, p. 89 – 100, 2012.
- PULZ, O. Photobioreactors: Production Systems for Phototrophic Microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 287 – 293, 2001.
- RAY, R. C.; JOSHI, V. K. Fermented foods: past, present and future. In: **Microorganisms and Fermentation of Traditional Foods**. Flórida: CRC Press, p. 1 – 36, 2015.

- REITERER, V. et al. *Pseudophosphatase* STYX Modulates Cell-Fate Decisions and Cell Migration by Spatiotemporal Regulation of ERK1/2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, p. E2934 – E2943, 2013.
- RIO-CHANONA, E. A. et al. Dynamic modeling and optimization of cyanobacterial C-phycocyanin production process by artificial neural network. **Algal research**, v. 13, p. 7 – 15, 2016.
- RODRIGUES, F.; LUDOVICO, P.; LEÃO, C. Sugar Metabolism in yeasts: an overview of aerobic and anaerobic glucose catabolism. In: **Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 101 – 122, 2006.
- RODRIGUES, D. B.; MENEZES, C. R.; MERCADANTE, A.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q. Bioactive pigments from microalgae *Phormidium autumnale*. **Food Research International**, v. 77, p. 273 – 279, 2015.
- ROSEN, A. D. Mechanism of Action of Moderate of Moderate-Intensity Static Magnetic Fields on Biological Systems. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 39, p. 163 – 173, 2003.
- SÁNCHEZ, J. F. et al. Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: influence of irradiance, dilution rate and temperature. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 719 – 729, 2008.
- SANTOS, L. O. **Estudo da produção de glutatona a partir de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliação da aplicação de campos magnéticos durante as fermentações**. 2008. 168 p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2008.
- SARANRAJ, P.; SIVASAKTHI, S. Spirulina Platensis – Food for Future: A Review. **Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology**, v. 4, p. 26 – 33, 2014.
- SCHMACHT, M. et al. Medium optimization based on yeast's elemental composition for glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 123, p. 555 – 561, 2017.
- SCHWAAB, M.; PINTO, J.C. Análise de dados experimentais I: Fundamentos de estatística e estimação de parâmetros, Rio de Janeiro: E-papers, 2007.
- SCHWAAB, M. et al. Nonlinear parameter estimation through particle swarm optimization. **Chemical Engineering Science**, v. 63, p. 1542 – 1552, 2008.
- SCHEWE, H. et al. High Concentrations of Biotechnologically Produced Astaxanthin by lowering pH in a *Phaffia rhodozyma* Bioprocess. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 319 – 326, 2017.
- SHAHEEN, M. et al. Application of low-intensity pulsed ultrasound to increase bio-ethanol production. **Renewable Energy**, v. 57, p. 462 – 468, 2013.
- SHAMPINE, L. F.; REICHEL, M. W. The MATLAB ODE Suite. **SIAM. Journal of Scientific Computing**, v. 18, p. 1 – 22, 1997.

- SHULLER, M. L.; KARGI, F. How cells growth. In: **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. 2 Ed. River: Prentice Hall, p. 155 – 206, 2002.
- SIKYTA, B. Kinetics of microbial growth and product formation. In: **Techniques in applied microbiology (Progress in industrial microbiology)**. Elsevier Science, p. 33 – 61, 1995.
- SILVEIRA, C. L.; MAZUTTI, M. A.; SALAU, N. P. G. Modeling the Microbial Growth and Temperature Profile in a Fixed-Bed Reactor. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 37, p. 1945 – 1954, 2014.
- SILVEIRA, C. L.; MAZUTTI, M. A.; SALAU, N. P. G. Identifyability measures to select the parameters to be estimated in a solid-state fermentation distributed parameter model. **Biotechnology Progress**, v. 32, p. 905 – 917, 2016.
- SINGHANIA, R. R. et al. Review Recent advances in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 13 – 18, 2009.
- SINGHANIA, R. R. et al. In: **Industrial Biotechnology: Products and Processes**. Weinheim: Wiley – VCH, 2017.
- SIVAPRAKASH, B.; KARUNANITHI, T. Modelling of Interaction Between *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* to Predict Stable Operating Conditions in a Chemostat. **International Journal of ChemTech Research**, v. 1, p. 338 – 343, 2009.
- SIVAPRAKASH, B.; KARUNANITHI, T.; JAYALAKSHMI S. Application of Software in Mathematical Bioscience for Modelling and Simulation of the Behaviour of Multiple Interactive Microbial Populations In.: **Technology Systems and Management**. Berlin: Springer, p. 128 – 137, 2011.
- SLAUGHTER, J. C. The biochemistry and physiology of yeast growth. In.: **Brewing Microbiology**. 3 ed. New York: Springer Science + Business Media, p. 19 – 66, 2003.
- SONI, R. A.; SUDHAKAR, K.; RANA, R. S. *Spirulina* – From Growth to Nutritional Product: A Review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 69, p. 157 – 171, 2017.
- SOROUR, N. M. et al. Microbial biosynthesis of health-promoting food ingredients. In.: **Food biosynthesis – Handbook of food bioengineering**, v.1. Londres: Academic Press, p. 55 – 94, 2017.
- SPEERS, A.; FORBES, J. Yeast: an overview. In: **Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste**. 3 ed. Kidlington: Elsevier, p. 3 – 10, 2015.
- STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste. In.: **Principles of Fermentation Technology**. 2 ed. Massachusetts: Butterworth-Heinemann, p. 1 – 12, 2003.
- STILES, M. E.; HOLZAPFEL, W. H. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 36, n. 1, p. 1–29, 1997.

- TAKAHASHI, J. A. et al. Fungos filamentosos e química: Velhos conhecidos, novos aliados. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 6, p. 2351 – 2382, 2017.
- TALARO, K. P.; TALARO, A. In.: **Foundations in Microbiology**. 4 ed. Boston: McGraw-Hill, p. 87 – 216, 2002.
- TAMIYA, H. et al. Correlation Between Photosynthesis and Light-Independent Metabolism in the Growth of *Chlorella*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 12, p. 23 – 40, 1953.
- TENG, H. C. A Puzzle of the Effect of Magnetic Field on Biological Cells. **Life Science Journal**, v. 2, p. 16 – 21, 2005.
- TENUZZO, B. et al. Biological Effects of 6 mT Static Magnetic Fields: A Comparative Study in Different Cell Types. **Bioelectromagnetics**, v. 27, p. 560 – 577, 2006.
- TORRES, N. V.; SANTOS, G. The (Mathematical) Modeling Process in Biosciences. **Frontiers in Genetics**, v. 6, p. 1 – 9, 2015.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 113 – 183, 2012.
- TSOULARIS, A.; WALLACE, J. Analysis of Logistic Growth Models. **Mathematical Bioscience**, v. 179, p. 21 – 55, 2002.
- TU, R. et al. Effect of Static Magnetic Field on the Oxygen Production of *Scenedesmus obliquus* Cultivated in Municipal Wastewater. **Water Research**, v. 86, p. 1 – 7, 2015.
- URNAU, L. et al. Use of low-cost agro-industrial substrate to obtain carotenoids from *Phaffia rhodozyma* in a bioreactor. **Industrial biotechnology**, v. 15, p. 25 – 34, 2019.
- USHARANI, G.; SARANRAJ, P.; KANCHANA, D. *Spirulina* Cultivation: A Review. **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 3, n.6, p. 1327 – 1341, 2012.
- VACHALI, P.; BHOSALE, P.; BERNSTEIN, P. S. Microbial carotenoids. In.: **Microbial carotenoids from fungi: Methods and protocols, methods in molecular biology**. Nova York: Springer Science+Business Media, vol. 898, p. 41 – 59, 2012.
- VÁZQUEZ, M. Effect of the light on carotenoid profile of *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains (formerly *Phaffia rhodozyma*). **Food Technol. Biotechnol.**, v. 39, p. 123 – 128, 2001.
- VEIGA, M. C. **Uso de diferentes condições de cultivo para obtenção de biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 com aplicação de campos magnéticos**. 2018. 82 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, 2018.
- VELIZAROV, S. Electric and Magnetic Fields in Microbial Biotechnology: Possibilities, Limitations, and Perspectives. **Electro – and Magnetobiology**, v. 18, p. 185 – 212, 1999.

- VERHULST, P. F. Notice sur la loi que la population poursuit dans son accroissement. **Correspondence Math Phys**, v. 10, p. 113 – 121, 1838.
- VINIEGRA-GONZALEZ, G. Solid State Fermentation: Definition, Characteristics, Limitations and Monitoring. In.: **Advances in Solid State Fermentation**. Montpellier: Springer – Science + Business Media, p. 5 – 22, 2013.
- VO, T. et al. The Growth and Lipid Accumulation of *Spirulina* sp. Under Different Light Conditions. **World Journal of Food Science and Technology**, v. 3, p. 101 – 104, 2017.
- WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to Fungal Physiology. In.: **Fungi: Biology and Applications**. Chichester: John Wiley & Sons, p. 1 – 34, 2005.
- WANG, J. D.; LEVIN, P. A. Metabolism, Cell Growth and the Bacterial Cell Cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 822 – 827, 2009.
- WEN, Z. Y.; CHEN, F. Heterotrophic Production of Eicosapentaenoic Acid by Microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 21, p. 273 – 294, 2003.
- WHITE, D.; DRUMMOND, J.; FUQUA, C. **The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes**. 4 ed. New York: Oxford University Press, 2012.
- YUAN, Y. An Example of Non-Convergence of Trust Region Algorithms. In.: **Yuan Y. Advances in Nonlinear Programming. Applied Optimization**, vol 14. Springer: Boston, p. 205–215 1998.
- YUAN, Y. A Review of Trust Region Algorithms for Optimization. In.: **Proceedings of the 4th International Congress on Industrial & Applied Mathematics (ICIAM 99)**, Edinburgh, p. 271-282., 2000.
- YUAN, Y. Recent Advances in Trust Region Algorithms. **Mathematical Programming**, v. 151, p. 249 – 281, 2015.
- ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une Cyanophycée: influence de divers facteurs physiques ET chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima***. Paris: Université Des Paris, 1966.
- ZHENG, Z. Y. et al. Artificial neural network – Genetic Algorithm to Optimize Wheat Germ Fermentation Condition: Application to the Production of two Anti-Tumor Benzoquinones. **Food Chemistry**, v. 15, p. 264 – 270, 2017.

APÊNDICE A

Figura A.1 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de *Phaffia rhodozyma* para 24 h de fermentação para o experimento 1.

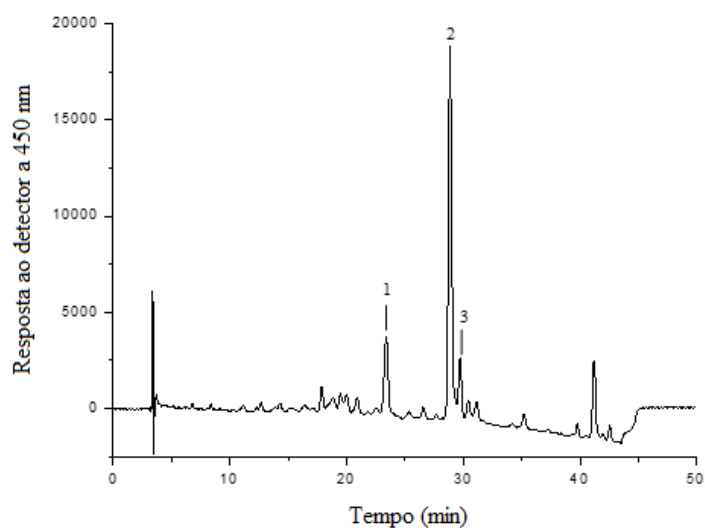


Figura A.2 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de *Phaffia rhodozyma* para 48 h de fermentação para o experimento 1.

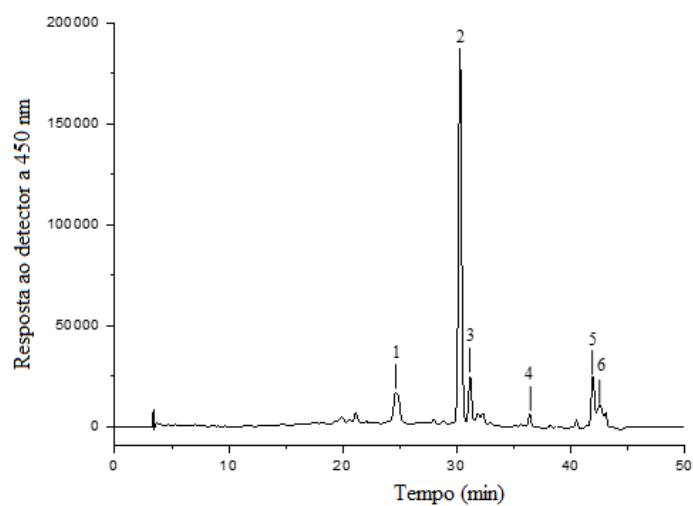


Figura A.3 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenóide de *Phaffia rhodozyma* para 72 h de fermentação para o experimento 1.

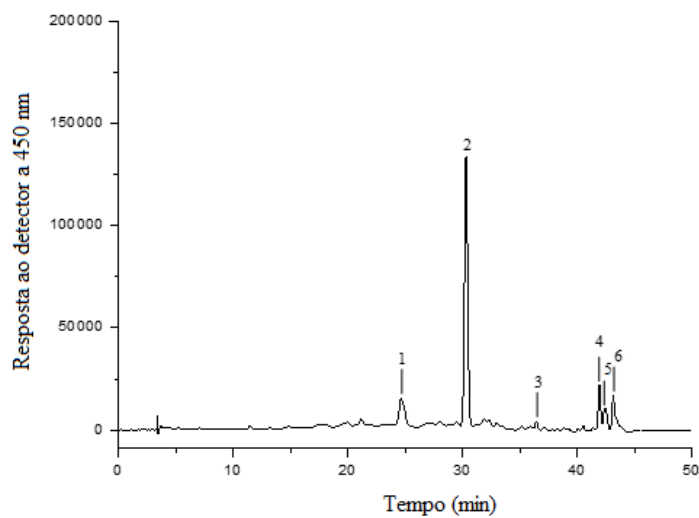


Figura A.4 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenóide de *Phaffia rhodozyma* para 96 h de fermentação para o experimento 1.

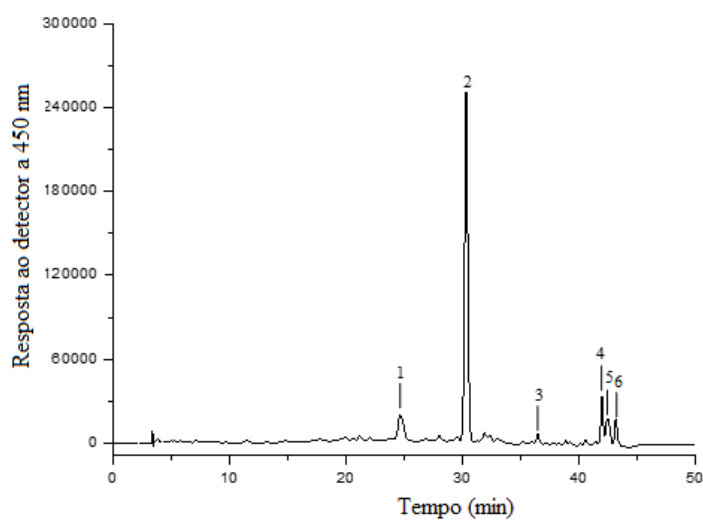


Figura A.5 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de *Phaffia rhodozyma* para 120 h de fermentação para o experimento 1.

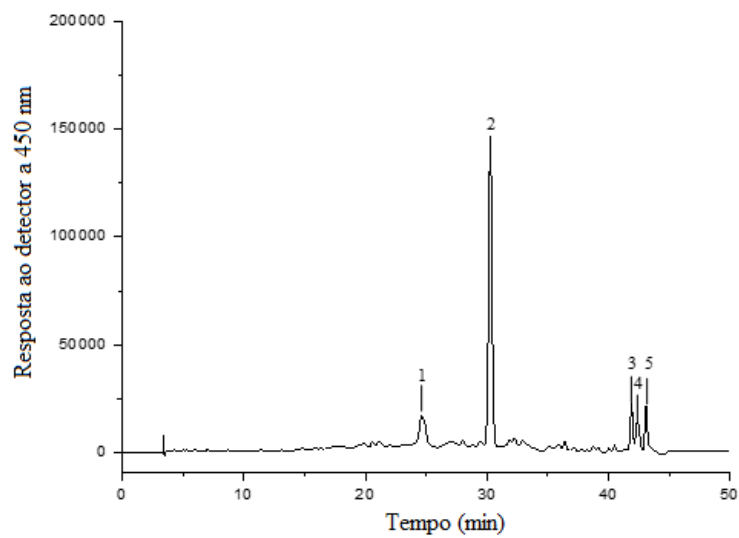


Figura A.6 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de *Phaffia rhodozyma* para 144 h de fermentação para o experimento 1.

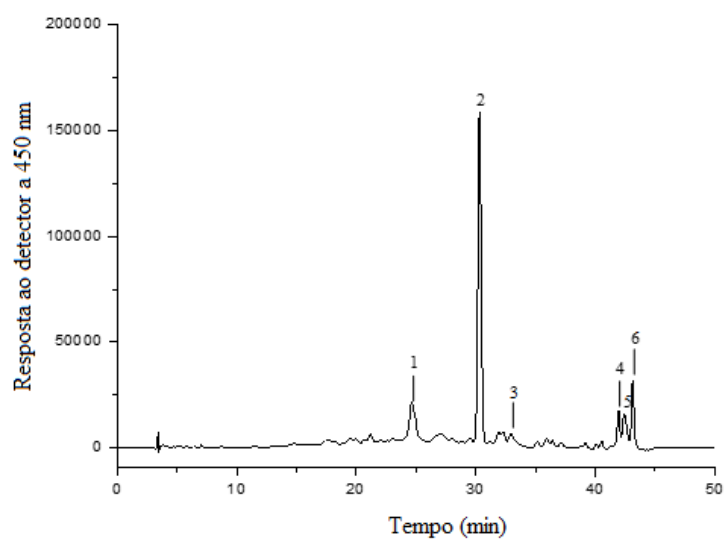


Figura A.7 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenóide de *Phaffia rhodozyma* para 168 h de fermentação para o experimento 1.

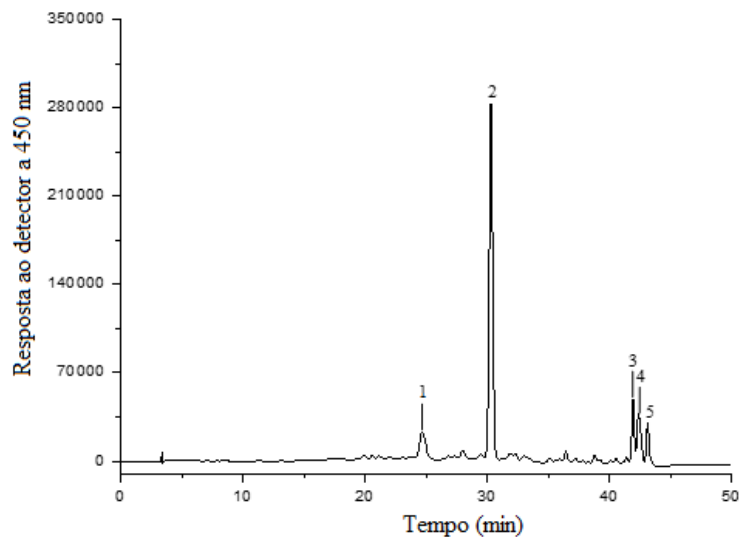


Figura A.8 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenóide de *Phaffia rhodozyma* para 24 h de fermentação para o experimento 2.

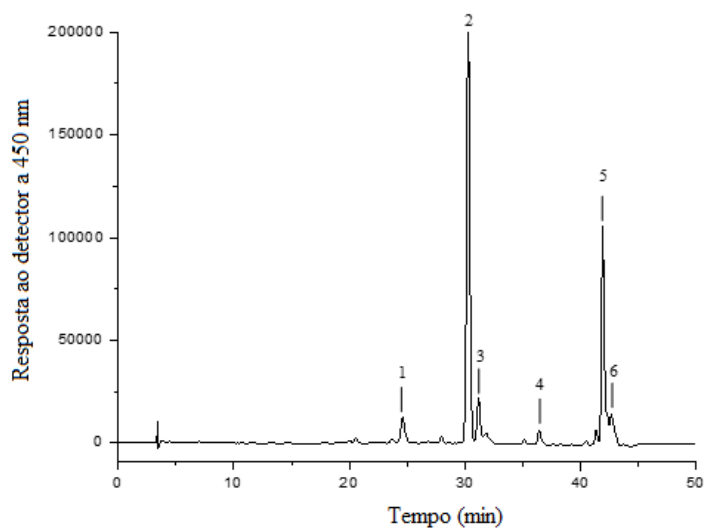


Figura A.9 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de *Phaffia rhodozyma* para 48 h de fermentação para o experimento 2.

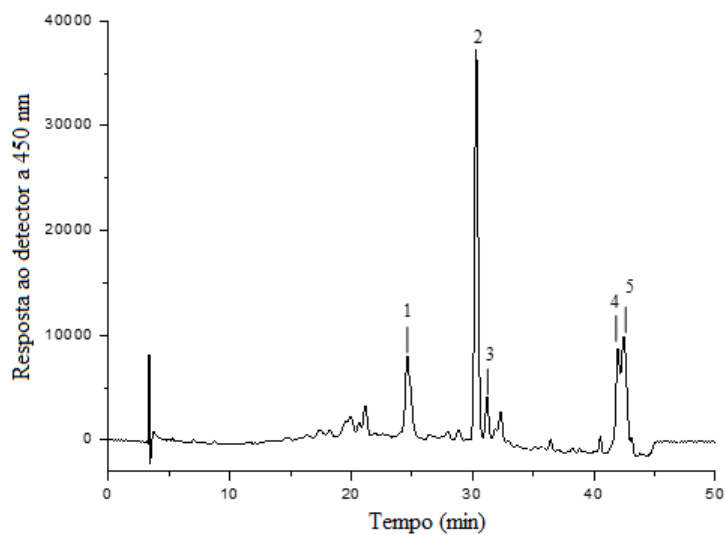


Figura A.10 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de *Phaffia rhodozyma* para 72 h de fermentação para o experimento 2.

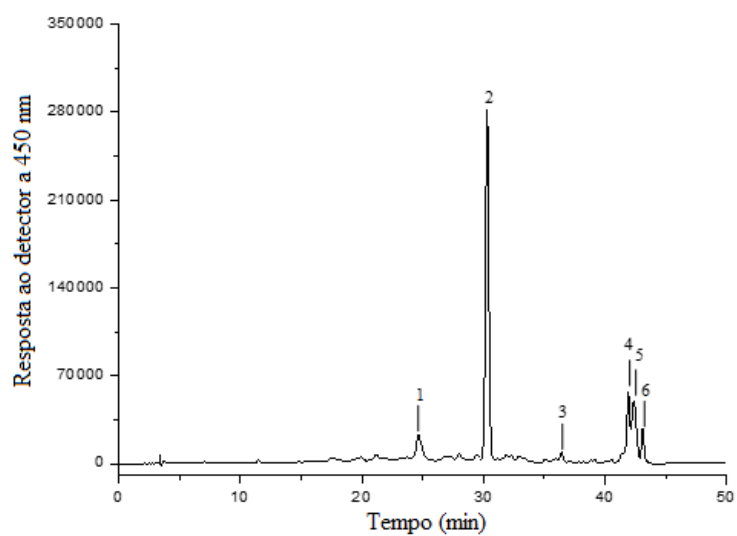


Figura A.11 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de *Phaffia rhodozyma* para 96 h de fermentação para o experimento 2.

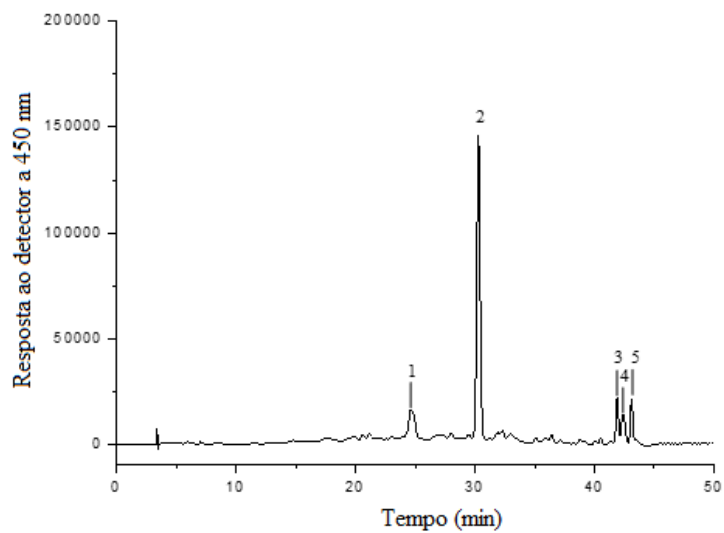


Figura A.12 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de *Phaffia rhodozyma* para 120 h de fermentação para o experimento 2.

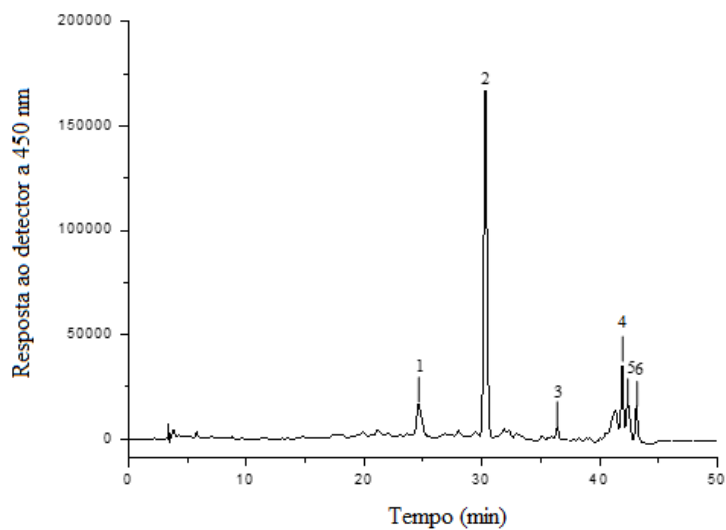


Figura A.13 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de *Phaffia rhodozyma* para 144 h de fermentação para o experimento 2.

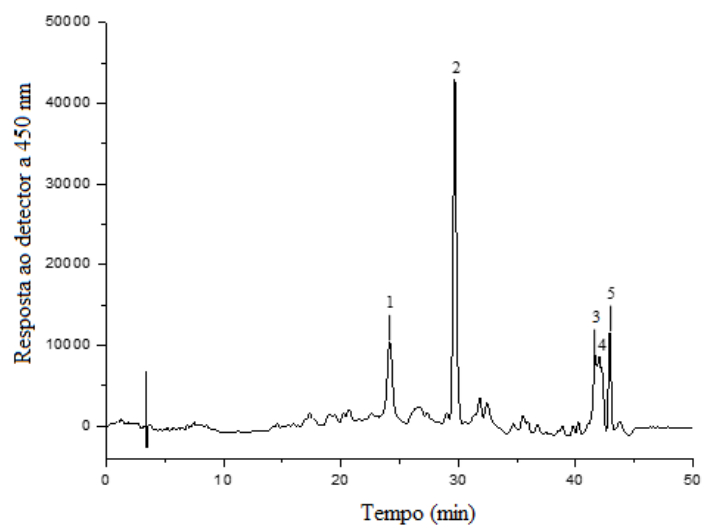


Figura A.14 - Cromatograma, obtido por HPLC – DAD, do extrato carotenoide de *Phaffia rhodozyma* para 168 h de fermentação para o experimento 2.

